



**SKRIPSI-TK141581**

**EKSTRAKSI SENYAWA FITOKIMIA DARI DAUN  
SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav)  
MENGUNAKAN AIR SUBKRITIS**

**Oleh :**

**Lailatul Fitri**

**NRP. 2311100016**

**Yunila Refit Wiratama**

**NRP. 2313105019**

**Dosen Pembimbing :**

**Siti Zullaikah, ST, MT, Ph.D**

**NIP. 197807162008122002**

**JURUSAN TEKNIK KIMIA  
FAKULTAS TEKNOLOGI INDUSTRI  
INSTITUT TEKNOLOGI SEPULUH NOPEMBER  
SURABAYA 2015**



**FINAL PROJECT-TK141581**

**EXTRACTION OF PHYTOCHEMICAL  
COMPOUNDS FROM INDONESIAN RED BETLE  
LEAVES (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) USING  
SUBCRITICAL WATER**

**By:**

**Lailatul Fitri**

**NRP. 2311100016**

**Yunila Refit Wiratama**

**NRP. 2313105019**

**Advisor :**

**Siti Zullaikah, ST, MT, Ph.D**

**NIP. 197807162008122002**

**CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT  
FACULTY OF INDUSTRIAL TECHNOLOGY  
SEPULUH NOPEMBER INSTITUTE OF TECHNOLOGY  
SURABAYA 2015**

## LEMBAR PENGESAHAN

### EKSTRAKSI SENYAWA FITOKIMIA DARI DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) MENGUNAKAN AIR SUBKRITIS

Diajukan Untuk Memenuhi Salah Satu Syarat Memperoleh  
Gelar Sarjana Teknik pada  
Program Studi S-1 Jurusan Teknik Kimia  
Institut Teknologi Sepuluh Nopember Surabaya

Oleh :

Lailatul Fitri

(2311100016)

Yunila Refit Wiratama

(2313105019)

Disetujui oleh Tim Penguji Tugas Akhir :

1. Siti Zullaikah ST, MT, PhD

(Pembimbing)

2. Prof.Dr.Ir.H.M. Rachimoellah, Dipl. EST

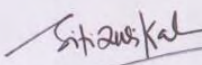
(Penguji I)

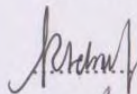
3. Dr.Ir. Susianto, DEA

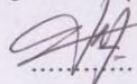
(Penguji II)

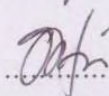
4. Fadlilatul Taufany, ST, PhD

(Penguji III)

  
.....

  
.....

  
.....

  
.....



Surabaya, 30 Juli 2015

# **EKSTRAKSI SENYAWA FITOKIMIA DARI DAUN SIRIH MERAH (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) MENGUNAKAN AIR SUBKRITIS**

**Nama/NRP** : Lailatul Fitri / 2311100016  
Yunila Refit Wiratama / 2313105019  
**Jurusan** : Teknik Kimia  
**Dosen Pembimbing** : Siti Zullaikah, ST, MT, Ph.D

## **ABSTRAK**

*Sirih merah telah digunakan oleh masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu untuk mengobati berbagai macam penyakit. Daun sirih merah dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis sebagai anti jamur, anti-inflamasi, antibakteri, antidiabetis, antiatherosklerosis, antitrombogenesis, antiviral dan lain-lain (Tapas dkk., 2008). Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari pengaruh suhu dan waktu pemanasan terhadap yield dan kandungan senyawa fitokimia dari daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) dan pengaruh suhu dan waktu terhadap kemampuan antioksidan dari ekstrak daun sirih merah. Ekstraksi dilakukan pada suhu subkritis air ( $<374^{\circ}\text{C}$ ) dengan pelarut berupa air murni. Pada dasarnya air bersifat polar namun, dengan adanya pemanasan akan menurunkan kepolaran air dan meningkatkan kelarutan dalam air. Ekstraksi dengan air subkritis tidak membutuhkan waktu yang lama dan ramah lingkungan. Dengan kelebihan-kelebihan ini, ekstraksi air subkritis diharapkan dapat menjadi metode alternatif untuk mengekstraksi kandungan senyawa fitokimia dari daun sirih merah.*

*Variabel tetap dalam penelitian ini adalah massa bahan (3 gram) dan volume pelarut (18 ml). Variabel berubah pada penelitian ini yaitu suhu reaksi 100;150; 200; 250; 300°C dan waktu reaksi 5;10;15;20;25 menit. Daun sirih merah dihaluskan kemudian ditimbang dan dimasukkan ke dalam reactor dengan ditambahkan aquades. Selanjutnya reaktor dimasukkan kedalam furnace yang telah diatur temperaturnya sesuai dengan variabel.*

*Ditunggu sampai 20 menit dengan asumsi suhu reaktor sama dengan suhu furnace, kemudian dilanjutkan waktu ekstraksi sesuai dengan variable. Larutan hasil ekstraksi dioven pada suhu 100°C untuk memisahkan ekstrak dari pelarutnya.*

*Dari hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa yield tertinggi diperoleh pada suhu 200°C saat waktu 20 menit yaitu sebesar  $9,13 \pm 0,707\%$ . Kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada suhu 200°C saat waktu 15 menit yaitu sebesar 282,8057 mg flavonoid/g daun sirih merah. Yield ekstrak daun sirih merah meningkat pada suhu 100 - 250°C dan menurun pada suhu 300°C, serta meningkat saat waktu 5 – 20 menit lalu mengalami penurunan saat waktu 25 menit. Kadar flavonoid dari daun sirih merah meningkat saat suhu 100 - 200°C dan menurun saat suhu 250°C, serta meningkat saat waktu 5 – 15 menit lalu mengalami penurunan saat waktu 20 menit. Kondisi terbaik untuk melakukan ekstraksi daun sirih merah dengan air subkritis adalah pada suhu 200°C dalam waktu 15-20 menit. Aktivitas antioksidan tertinggi dari ekstrak daun sirih merah adalah pada suhu 200°C saat waktu 20 menit yaitu  $100,443 \pm 0,54$  mg vitamin C/L dengan nilai  $IC_{50}$  pada suhu 200 °C adalah 6,306 µg/mL. 7. Aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah meningkat pada suhu 100 - 200°C dan menurun pada suhu 250°C, serta meningkat saat waktu 5 – 20 menit lalu mengalami penurunan saat waktu 25 menit.*

**Kata kunci:** ekstraksi subkritis, daun sirih merah, senyawa flavonoid, antioksidan

# **PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS EXTRACTION FROM INDONESIAN RED BETLE LEAVES (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) USING SUBCRITICAL WATER**

**Name/NRP : Lailatul Fitri / 2311100016**  
**Yunila Refit Wiratama / 2313105019**  
**Departement : Chemical Engineering**  
**Advisor : Siti Zullaikah, ST, MT, Ph.D**

## **ABSTRACT**

*Indonesian red betle leaves have been used by Indonesian people since away back to cure various diseases. Indonesian red betle leaves was reported have pharmacological activity as antifungal, anti-inflammatory, antibacteria, antidiabetic, antiatherosclerotic, antitirhombogenic, antiviral etc. (Tapas dkk., 2008). This research aimed to learn the influences of heating temperatures and times toward yield and phytochemical compounds in Indonesian red betle leaves that extracted by subcritical water extraction and the influences of heating temperatures and times toward antioxidants activity of Indonesian red betle leaves extract. The extraction was carried out at subcritical water temperature (<374°C) with water as the solvent. Basically water was polaric but, heating would decrease water polarity and increase solubility in the water. Extraction by subcritical water doesn't need much time and area friendly. With these superiorities, subcritical water extraction was expected can be an alternative method to extract phytochemical compounds from Indonesian red betle leaves.*

*Constant variables used in this research were material mass (3 grams) and solvent volume (18 ml). The changed variables were heating temperatures of 100;150;200;250;300°C and heating times of 5;10;15;20;25 minutes. Indonesian red betle leaves were crushed into very smal pieces and weighed as many as 3 grams, and pour them into the reactor with adding aquadest. After that, put the reactor into furnace which have been set on the*

*desired temperature. Waiting for 20 minutes with asumed that reactor have same temperature with furnace, then made a time countdown for desired time. The liquid products were heated in the oven at 100°C temperature to evaporate the solvent.*

*From the results of this research can be concluded that the highest yield were gained at 200°C at 20 minutes that is  $9,13 \pm 0,707\%$ . The highest flavonoid content were gained at 200°C at 15 minutes that is 282,8057 mg flavonoids/g red betle leaves. Extract yield increased at 100 - 250°C and decreased at 300°C, also increased in time of 5 – 20 minutes and then decreased in time of 25 minutes. Flavonoids content of red betle leaves increased at 100 - 200°C and decreased at 250°C, also increased in time of 5 – 15 minutes then decreased in time of 20 minutes. The best condition to doing Indonesian red betle leaves extraction using subcritical water is at 200°C in time of 15-20 minutes. The highest antioxidant activity from Indonesian red betle leaves is at 200°C in 20 minutes heating time that is 100,443 µg vitamin C/L which at 200 °C amount of  $IC_{50} = 6,306 \mu\text{g/mL}$ . Antioxydant activity of Indonesian red betle leaves increased at 100 - 200°C and decreased at 250°C, also increased in time of 5 – 20 minutes then decreased in time of 25 minutes.*

**Keywords:** *Subcritical water extraction, Indonesian red betle leaves, flavonoid compounds, antioxidant*

## KATA PENGANTAR

Alhamdulillahirobbil'alamiin, segala puji kami haturkan kepada Tuhan kami Allah SWT yang telah menganugerahkan semangat dan kekuatan kepada kami sehingga kami dapat menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul “Ekstraksi Senyawa Fitokimia dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Menggunakan Air Subkritis” ini dengan sebaik-baiknya.

Untuk bantuan, bimbingan dan dukungan dalam penyusunan proposal ini, kami sampaikan rasa terimakasih kepada:

1. Allah SWT yang dengan Maha Besar telah memberikan kekuatan dan petunjuk hingga terselesaikan dengan baik laporan Skripsi ini
2. Kedua orang tua kami tercinta yang telah mendukung dan mendoakan kami
3. Prof. Dr. Ir.Tri Widjaja, M.Eng selaku Ketua Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS
4. Setiyo Gunawan, S.T., Ph.D selaku Sekretaris Jurusan dan Koordinator Tugas Akhir Teknik Kimia FTI-ITS
5. Prof.Dr.Ir.H.M.Rachimoellah, Dipl.EST selaku Kepala Laboratorium Biomassa dan Konversi Energi
6. Dosen pembimbing kami Siti Zullaikah, ST, MT, Ph.D yang telah membimbing dan mengarahkan hingga laporan Skripsi ini selesai
7. Teman-teman kami yang telah ikut memberikan semangat dan semua pihak yang tidak dapat kami sebutkan satu persatu.

Besar harapan kami agar laporan Skripsi ini nantinya berguna bagi para pembaca maupun bagi kami pribadi. Walaupun begitu, “Tak ada gading yang tak retak”, begitu juga dengan proposal ini yang masih jauh dari kata sempurna.

Surabaya, Juni 2015  
Penulis



## DAFTAR ISI

Lembar Pengesahan	
Abstrak (Indonesia) .....	i
Abstract (English).....	iii
Kata Pengantar .....	v
Daftar Isi.....	vi
Daftar Gambar.....	viii
Daftar Tabel.....	ix
Daftar Grafik .....	x
BAB I PENDAHULUAN	
I.1 Latar Belakang.....	1
I.2 Rumusan Masalah.....	2
I.3 Batasan Masalah .....	3
I.4 Tujuan Penelitian .....	3
I.5 Manfaat Penelitian .....	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
II.1 Sirih Merah .....	5
II.2 Metode Ekstraksi Daun Sirih Merah .....	8
II.3 Flavonoid.....	13
II.4 Kuersetin.....	15
II.5 Antioksidan.....	16
II.6 Penelitian Terdahulu.....	17
BAB III METODOLOGI PENELITIAN	
III.1 Bahan yang Digunakan .....	19
III.2 Variabel Penelitian .....	19
III.3 Prosedur Penelitian.....	20
III.4 Metode Analisa .....	21
III.6 Diagram Alir Penelitian .....	25
BAB IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
IV.1 Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Yield dan Kadar Flavonoid .....	28
IV.2 Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Ekstraksi	

Terhadap Aktivitas Antioksidan.....	31
BAB V KESIMPULAN	
Daftar Pustaka .....	xi
Daftar Notasi .....	xiv
LAMPIRAN :	
APPENDIKSA	
APPENDIKS B	
APPENDIKS C	

## DAFTAR GAMBAR

Gambar II.1 Morfologi Tanaman Sirih Merah ( <i>Piper crocatum</i> Ruiz & Pav) .....	6
Gambar II.2 Rangkaian Alat Ekstraksi Soxhlet.....	9
Gambar II.3 Sifat Fisik Air Sebagai Fungsi Suhu pada Tekanan 250 bar .....	11
Gambar II.4 Diagram Fase Air .....	11
Gambar II.5 Struktur Flavonoid, Isoflavonoid, Neoflavonoid .....	14
Gambar II.6 Struktur Kuersetin.....	15
Gambar III.1 Diagram Alir Ekstraksi Daun Sirih Merah .....	26
Gambar III.2 Diagram Alir Analisa Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah.....	26
Gambar IV.1 Struktur DPPH Sebelum dan Sesudah Bereaksi dengan Antioksidan .....	31

## DAFTAR NOTASI

Simbol	Keterangan	Satuan
$\varepsilon$	Konstanta dielektrik	-
ID	Diameter dalam	inci
m	Massa	gram
OD	Diameter luar	inci
P	Tekanan	bar, atm
t	Waktu	Jam, menit
T	Suhu	K, °C
v	Volume	ml

## BIOGRAFI PENULIS

Penulis yang bernama lengkap Lailatul Fitri, biasa dipanggil Fitri dilahirkan di Blitar, 23 April 1993 merupakan anak ketiga dari tiga bersaudara. Penulis telah menempuh pendidikan formal dimulai dari SDN 5 Wates – Blitar, SMPN 1 Wates – Blitar, SMA N 1 Talun – Blitar. Setelah lulus dari SMA N 1 Talun, penulis mengikuti ujian masuk dan diterima di Jurusan Teknik Kimia FTI-ITS dan telah terdaftar dengan NRP 2311100016. Pada jurusan Teknik Kimia penulis mengambil Bidang Studi Biomassa dan Konversi Energi. Penulis telah menyelesaikan tugas pra desain pabrik dengan judul “Pra Desain Pabrik Gula Cair dari Tebu” dan skripsi dengan judul “Ekstraksi Senyawa Fitokimia dari daun *Piper crocatum Ruiz & Pav*” menjadikan penulis sebagai Sarjana Teknik. Penulis dengan motto “Catch your dream” berharap di kedepannya dapat menaiki anak tangga yang lebih tinggi lagi.

## BIOGRAFI PENULIS

Penulis bernama lengkap Yunila Refit Wiratama, biasa dipanggil Refit, lahir dan besar di Pacitan. Anak pertama dari dua bersaudara lahir pada tanggal 30 Juni 1991. Penulis telah menempuh pendidikan formal dimulai dari SDN Sudimoro II –Pacitan, SMPN 1 Sudimoro – Pacitan, SMAN 1 Pacitan. Setelah lulus dari SMAN 1 Pacitan, penulis meneruskan pendidikan di D3 Teknik Kimia ITS dan lulus pada tahun 2013. Setelah itu, penulis menempuh pendidikan di S1 Teknik Kimia ITS melalui program Lintas Jalur dengan NRP 2313105019. Pada jurusan Teknik Kimia penulis mengambil Bidang Studi Biomassa dan Konversi Energi. Penulis telah menyelesaikan tugas pra desain pabrik dengan judul “Pra Desain Pabrik Gula Cair dari Tebu” dan skripsi dengan judul “Ekstraksi Senyawa Fitokimia dari Daun Sirih Merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) Menggunakan Air Subkritis”. Penulis dengan motto “Almost is never enough” berharap untuk terus dapat mengejar impian dan dapat membagikan ilmu yang bermanfaat.

## **BAB IV**

### **HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN**

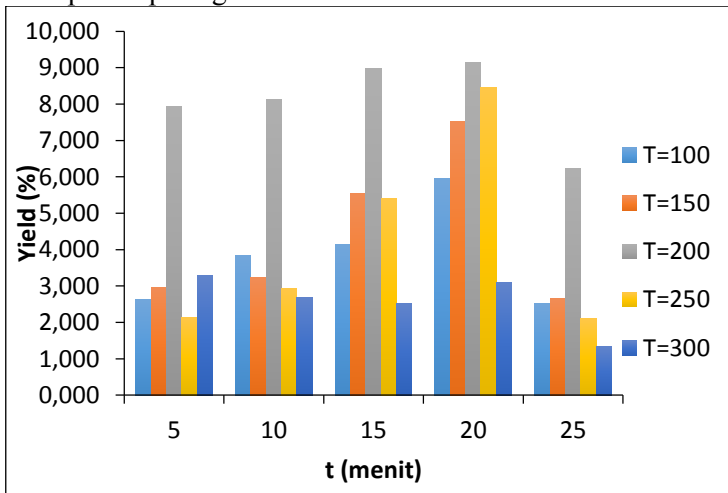
Pada umumnya ekstraksi senyawa fitokimia sirih merah dilakukan menggunakan metode soxhletasi atau maserasi dengan pelarut berupa etanol atau metanol. Namun, dalam penelitian ini ekstraksi sirih merah dilakukan dengan air subkritis karena beberapa alasan. Pertama, untuk menghindari adanya kemungkinan pelarut organik yang terikut di dalam ekstrak. Dalam aplikasinya, flavonoid biasanya digunakan di bidang farmasi sebagai bahan baku pembuatan obat. Oleh karena itu, air dipilih sebagai pelarut karena lebih aman dan ramah lingkungan. Ke dua, konstanta dielektrik air pada kondisi subkritis mendekati konstanta dielektrik etanol (30) dan metanol (33) pada suhu ruang sehingga dapat lebih mudah melarutkan senyawa fitokimia di dalam daun sirih merah yang merupakan senyawa polar. Air pada suhu ruang memiliki tetapan dielektrik yang tinggi yaitu 80, namun pada suhu sekitar 200 – 250°C tetapan dielektriknya turun menjadi sekitar 24 (Luque de Castro M.D dkk, 1999). Peningkatan atau penurunan ion hidrogen dan hidroksida dalam air subkritis bersamaan dengan menurunnya tetapan dielektrik, sehingga pelarut ini sangat sesuai untuk ekstraksi bahan-bahan yang berasal dari tumbuhan.

Dalam penelitian ini, daun sirih merah diekstrak pada suhu 100, 150, 200, 250 dan 300°C dalam waktu 5, 10, 15, 20 dan 25 menit dengan perbandingan berat bahan dengan volume pelarut adalah 1 : 6 (3 gram bahan : 18 ml aquades) untuk mengetahui efek pemanasan pada ekstrak yang dihasilkan. Percobaan ini dilakukan secara duplo untuk mendapatkan hasil yang terbaik. Hasil ekstraksi selanjutnya dianalisa menggunakan spektrofotometer UV-Vis untuk mengetahui pengaruh suhu dan lama waktu ekstraksi terhadap kadar flavonoid dan aktivitas antioksidan dari daun sirih merah.

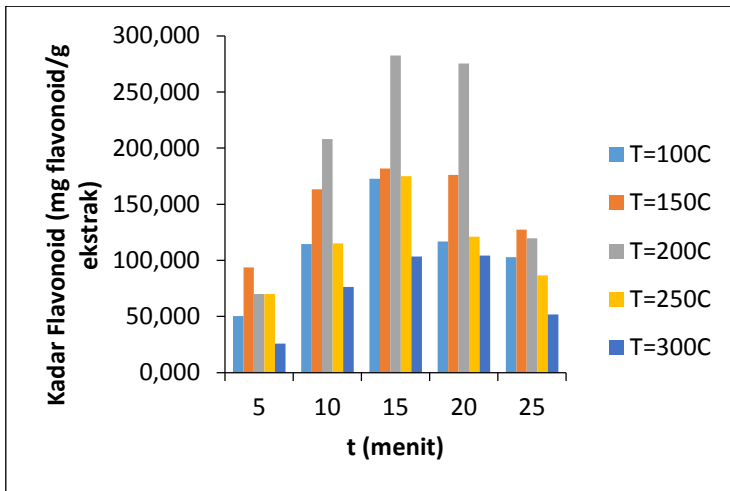
#### IV.1 Pengaruh Suhu dan Lama Waktu Ekstraksi Terhadap Yield dan Kadar Flavonoid

Daun sirih merah diketahui mengandung senyawa-senyawa seperti glikosid, steroid, tanin, flavonoid dan antrakinon (Reveny, 2011). Senyawa-senyawa tersebut bersifat sensitif terhadap panas sehingga akan mudah rusak jika dipanasi pada suhu tinggi dan dalam waktu lama.

Dari hasil penelitian ini, yield ekstrak dan kadar flavonoid dari daun sirih merah dengan variabel suhu 100; 150; 200; 250; 300°C dalam waktu 5; 10; 15; 20; 25 menit dapat ditampilkan pada grafik berikut ini.



**Grafik IV.1** Pengaruh Suhu dan Waktu terhadap Yield Ekstrak Daun Sirih Merah



**Grafik IV.2** Pengaruh Suhu dan Waktu terhadap Kadar Flavonoid dalam Ekstrak Daun Sirih Merah

Dari kedua grafik di atas dapat dilihat bahwa yield dan kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada suhu 200°C pada waktu 15-20 menit ekstraksi. Hal ini dikarenakan pada suhu 200°C konstanta dielektrik air sama dengan konstanta dielektrik metanol pada suhu ruang yaitu sebesar 33, sehingga dapat melarutkan senyawa fitokimia pada daun sirih merah dengan lebih baik. Pada kondisi ini sifat air berubah menjadi senyawa yang lebih nonpolar sehingga sangat sesuai untuk mengekstraksi senyawa flavonoid dari daun sirih merah yang lebih mudah larut pada pelarut semipolar. Senyawa fitokimia dalam daun sirih merah khususnya flavonoid sangat rentan terhadap panas dan mudah teroksidasi pada suhu tinggi, maka dari itu sebaiknya ekstraksi dilakukan dalam waktu yang tidak terlalu lama untuk menghindari terjadinya degradasi senyawa flavonoid. Semakin lama pemanasan akan semakin sedikit kadar flavonoid yang dihasilkan. Hal tersebut dikarenakan proses pemanasan akan membuat kadar total flavonoid berkurang sebesar 15-78% (Lusivera, 2002).



Pada penelitian ini yield ekstrak tertinggi diperoleh pada suhu 200°C saat waktu 20 menit yaitu sebesar  $9,13 \pm 0,707\%$ . Hal ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Meizoso dkk., di mana daun oregano yang diekstrak menggunakan air subkritis menghasilkan yield terbesar, yaitu 54% berat kering, pada suhu 200°C. Namun, kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada saat waktu 15 menit yaitu sebesar  $282,411 \pm 0,559$  mg flavonoid/g sampel. Hal ini sesuai dengan yang dilakukan oleh Jung Ko dkk. (2011) di mana kulit bawang yang diekstrak menggunakan air subkritis menghasilkan flavonol kuersetin tertinggi, yaitu  $16,29 \pm 0,75$  mg/g kulit bawang, pada saat waktu 15 menit.

Yield ekstrak daun sirih merah cenderung naik hingga saat waktu 20 menit namun mengalami penurunan saat waktu 25 menit. Meskipun begitu, tidak semua sampel mengalami kecenderungan yang sama. Hal ini dikarenakan umur daun sirih merah yang digunakan kurang seragam untuk semua variabel. Selain itu, kesalahan teknis seperti kurang halus saat menumbuk juga ikut mempengaruhi yield yang dihasilkan. Sementara itu, terjadi kenaikan kadar flavonoid hingga saat waktu 15 menit dan turun setelah waktu 20 menit pada semua variabel suhu. Berdasarkan hasil ini, maka kondisi terbaik untuk melakukan ekstraksi daun sirih merah dengan air subkritis adalah pada suhu 200°C selama 15-20 menit. Selain itu, untuk mendapatkan hasil ekstraksi terbaik, sebaiknya diberikan perlakuan khusus agar degradasi senyawa fitokimia dapat dikurangi.

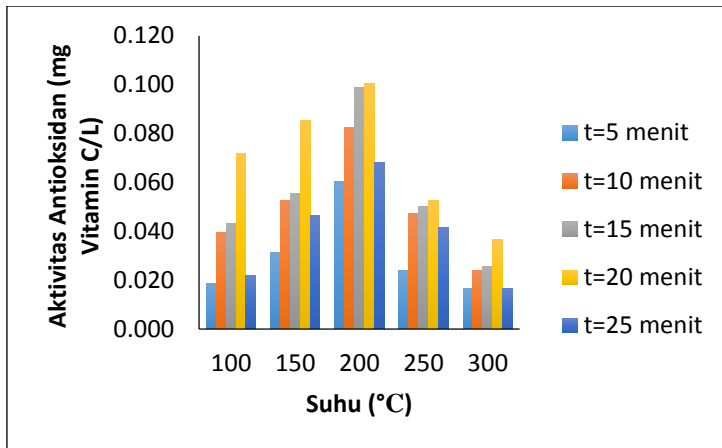
Sebagai pembandingan dilakukan maserasi menggunakan pelarut metanol dan n-heksan. Maserasi dilakukan selama 96 jam dan diperoleh yield metanol dan n-heksan masing-masing sebesar 3,3% dan 0,843%. Dalam hal ini, pelarut metanol melarutkan dengan lebih baik daripada n-heksan karena metanol bersifat polar sedangkan n-heksan bersifat non-polar sehingga flavonoid dalam daun sirih merah yang merupakan senyawa polar akan lebih mudah larut dalam metanol.



kurva standar sehingga diperoleh persamaan garis lurus berikut,

$$y = 255,21 x$$

Hubungana ktivitas antioksidan dengan suhu ekstraksi daun sirih merah dinyatakan dalam grafik di bawah ini.



**Grafik IV.3** Pengaruh Suhu dan Waktu Terhadap Aktivitas Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah

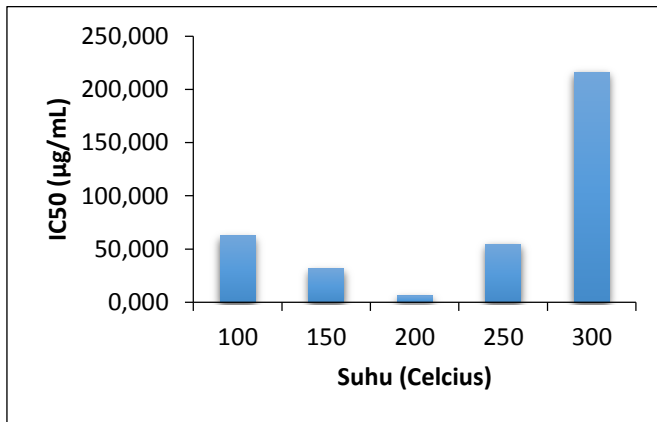
Aktivitas antioksidan tertinggi yaitu pada suhu 200°C saat waktu 20 menit yaitu 100,443 mg vitamin C/L, hal ini menunjukkan tingginya konsentrasi vitamin C pada daun sirih merah. Aktivitas antioksidan tertinggi menunjukkan hasil yang sama dengan hasil yang diperoleh dari yield ekstrak dan kadar flavonoid tertinggi pada suhu 200°C saat waktu 15-20 menit. Sedangkan untuk hasil uji antioksidan dari ekstraksi daun sirih merah dengan metode maserasi, aktivitas antioksidan tertinggi dengan menggunakan pelarut methanol yaitu 112,292 mg vitamin C/L. Proses ekstraksi daun sirih merah dengan metode maserasi menggunakan pelarut methanol memiliki aktivitas antioksidan yang paling tinggi, karena methanol mampu

mengekstrak daun sirih merah dengan yield yang paling tinggi. Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, hal ini karena methanol memiliki tetapan dielektrik yang rendah yaitu 33. Di mana derajat kepolaran bergantung pada tetapan dielektrik, makin besar tetapan dielektrik maka akan semakin polar pelarut tersebut, sebaliknya semakin rendah tetapan dielektrik maka kepolarannya akan turun.

Aktivitas antioksidan dari daun sirih merah dapat ditentukan dengan menggunakan persamaan diatas, dimana  $y$  menunjukkan konsentrasi aktivitas antioksidan dan  $x$  adalah bsorbansi. Pada Grafik IV.4 menunjukkan besarnya konsentrasi aktivitas antioksidan dalam berbagai suhu dan waktu. Dari perhitungan berdasarkan persamaan di atas didapatkan aktivitas antioksidan tertinggi pada waktu 20 menit pada suhu 200 °C. Prosedur uji aktivitas antioksidan ini dilakukan sama dengan prosedur sebelumnya. Pada metode ekstraksi subkritis walaupun didapatkan aktivitas antioksidan yang lebih rendah daripada metode maserasi, namun dari segi waktu metode ekstraksi subkritis lebih efisien dibandingkan maserasi dengan aktivitas antioksidan yang tinggi. Selanjutnya untuk waktu dan suhu yang lain, aktivitas antioksidan menunjukkan perilaku yang sama dengan waktu dan suhu terbaik.

Kemampuan antioksidan ekstraksi daun sirih merah bisa terlihat dari nilai  $IC_{50}$ ,  $IC_{50}$  adalah bilangan yang menunjukkan konsentrasi ekstrak ( $\mu\text{g/mL}$ ) yang mampu menghambat 50% oksidasi. Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  semakin tinggi aktivitas antioksidan (Yuhernita dan Juniarti, 2011). Suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 50, kuat (50-100), sedang (100-150), dan lemah (151-200). Kekuatan itu dianalisis dengan metode DPPH (2,2-diphenil-1- picrylhydrazil radical). Data-data absorbansi dari sampel ekstrak daun sirih merah dapat dianalisis kemampuan antioksidan dengan menggunakan persamaan garis regresi yang diperoleh dari kurva hubungan antara konsentrasi atau waktu (sebagai sumbu  $x$ ) dan nilai peredaman radikal bebas

(sebagai sumbu y), kemudian didapatkan persamaan  $y = a + bx$ , di mana nilai  $y = 50\%$ , yang selanjutnya digunakan untuk memperoleh nilai  $IC_{50}$  (Inhibition Concentration 50) yaitu konsentrasi antioksidan yang mampu menghambat 50% radikal bebas.



**Grafik IV.4** Nilai  $IC_{50}$  Ekstrak Daun Sirih Merah

Dari **Grafik IV.4** terlihat bahwa aktivitas antioksidan yang paling tinggi terdapat pada ekstrak sirih merah pada suhu 200 °C (nilai  $IC_{50} = 6,306 \mu\text{g/mL}$  ). Sebagai control positif digunakan vitamin C dengan nilai  $IC_{50}$  yaitu 0,2954  $\mu\text{g/mL}$ . Aktivitas antioksidan control positif lebih tinggi dari sampel, di mana semakin kecil nilai  $IC_{50}$  maka semakin kuat kemampuan antioksidan dari sampel tersebut. Hasil ini sesuai dengan hasil yang diperoleh dari penelitian Serlahwaty 2011, hasil  $IC_{50}$  dari ekstrak daun sirih merah yaitu 60,35  $\mu\text{g/mL}$  sementara control positifnya menggunakan vitamin C dengan nilai 7,39  $\mu\text{g/mL}$ . Hasil percobaan menunjukkan ekstrak daun sirih merah pada suhu 200°C memiliki aktivitas antioksidan yang sangat kuat (kurang dari 50  $\mu\text{g/mL}$ ) begitu juga vitamin C. Tetapi aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah lebih rendah jikadibandingkan dengan vitamin C sebagai control

positif, hal itu dikarenakan vitamin C merupakan senyawa murni, sedangkan ekstrak daun sirih merah terdiri dari beberapa senyawa campuran.

Senyawa flavonoid, fenolik dan tannin diperkirakan merupakan senyawa yang bertanggungjawab terhadap aktivitas antioksidan. Kemampuan senyawa flavonoid sebagai antioksidan telah dibuktikan oleh Yuhernitadan Juniarti pada tahun 2011 dalam penelitiannya terhadap aktivitas antioksidan daun surian. Aktivitas antioksidan pada senyawa flavonoid karena merupakan senyawa dengan gugus  $-OH$  yang terikat pada karbon cicin aromatic. Senyawa fenol ini mempunyai kemampuan untuk menyumbangkan atom hidrogen, sehingga radikal DPPH dapat tereduksi menjadi bentuk yang lebih stabil.

Halaman ini sengaja dikosongkan

# **BAB I**

## **PENDAHULUAN**

### **I.1 Latar Belakang**

Sirih merah telah digunakan oleh masyarakat Indonesia sejak zaman dahulu untuk mengobati berbagai macam penyakit. Masyarakat percaya bahwa sirih merah dapat menyembuhkan penyakit-penyakit seperti batuk hingga diabetes. Bahkan saat ini telah banyak dijual kapsul sirih merah.

Saat ini sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) semakin banyak diteliti karena dilaporkan memiliki aktivitas farmakologis sebagai anti jamur, anti-inflamasi, antibakteri, antidiabetis, antiatherosklerosis, antitrombogenesis, antiviral dan lain-lain (Tapas dkk., 2008). Sirih merah memiliki senyawa fitokimia yakni minyak atsiri, *alkaloid*, *saponin*, *tannin* dan *flavonoid*. Kandungan kimia lainnya yang terdapat di daun sirih merah adalah *hidroksikavikol*, *kavikol*, *kavibetol*, *karvakrol*, *eugenol*, *p-simen*, *karioilen*, *kadmenestragol*, *tepenena*, dan *fenilpropanoid* (Sulistiyani dkk, 2007).

Penelitian yang dilakukan Astuti et.al (2014) membuktikan bahwa *endophytic fungi* yang diisolasi dari daun sirih merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* serta dapat menghambat pertumbuhan sel T47D dan sel WiDr. Kedua sel tersebut merupakan sel kanker payudara dan kanker usus (*colon*) yang telah banyak menyebabkan kematian. Sementara itu, dari hasil penelitian yang dilakukan oleh Jain et.al (2014), dengan jelas mengindikasikan bahwa senyawa flavonoid lebih efektif memperendah *postprandial hyperglycemia* (kadar gula darah setelah makan) dibanding ekstrak kasar lainnya.

Senyawa fitokimia adalah sejenis zat alami yang ada pada tumbuhan, yang berfungsi sebagai pemberi aroma, warna dan rasa pada tumbuhan tersebut. Hingga saat ini hampir 30.000 jenis fitokimia yang ditemukan dan sekitar 10.000 terkandung



dalam setiap makanan. Kombinasi senyawa fitokimia itu menghasilkan enzim-enzim sebagai detoksifikasi (penangkal racun), perangsang sistem imun (pertahanan tubuh), mencegah trombosit (penggumpalan keping darah), meningkatkan metabolisme hormon, meningkatkan pencernaan dan pengikat zat karsinogenik dalam usus, antibakteri, antivirus dan antioksidan, mengatur gula darah serta antikanker.

Pada umumnya untuk mendapatkan ekstrak senyawa fitokimia daun sirih merah dilakukan ekstraksi secara maserasi menggunakan pelarut seperti metanol, etanol, etil asetat dan sejenisnya. Namun metode ekstraksi ini membutuhkan waktu yang cukup lama. Selain itu, penggunaan pelarut-pelarut tersebut dapat mempengaruhi kandungan ekstrak yang dihasilkan karena sifat antara pelarut yang satu dengan yang lain berbeda-beda. Misalnya, etanol bersifat polar maka yang akan terekstrak lebih banyak adalah senyawa polar, sedangkan etil asetat bersifat nonpolar maka yang akan terekstrak lebih banyak adalah senyawa nonpolar. Harganya pun cukup mahal dan kurang ramah lingkungan.

Berdasarkan hal-hal tersebut maka dilakukan penelitian mengenai ekstraksi daun sirih merah dengan metode air subkritis. Ekstraksi dilakukan pada suhu subkritis air ( $<374^{\circ}\text{C}$ ) dengan pelarut berupa air murni. Pada dasarnya air bersifat polar namun, dengan adanya pemanasan akan menurunkan kepolaran air dan meningkatkan kelarutan dalam air. Ekstraksi dengan air subkritis tidak membutuhkan waktu yang lama dan ramah lingkungan. Dengan kelebihan-kelebihan ini, ekstraksi air subkritis diharapkan dapat menjadi metode alternatif untuk mengekstrak kandungan senyawa fitokimia dari daun sirih merah.

## **I.2 Rumusan Masalah**

Dengan memperhatikan latar belakang di atas, maka dibuat rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana pengaruh suhu dan waktu terhadap yield dan kandungan senyawa fitokimia dari daun sirih merah (*Piper crocatum Ruiz & Pav*) yang diekstrak dengan metode alternatif air subkritis?
2. Bagaimana pengaruh suhu dan waktu yang digunakan terhadap kemampuan antioksidan daun sirih merah?

### **I.3 Batasan Masalah**

Dalam penelitian ini digunakan beberapa batasan masalah, yaitu:

1. Proses ekstraksi daun sirih merah menggunakan metode air subkritis.
2. Proses ekstraksi daun sirih merah menggunakan metode maserasi sebagai pembanding dengan pelarut methanol dan n-hexane.

### **I.4 Tujuan Penelitian**

Penelitian ini bertujuan untuk:

1. Mempelajari pengaruh suhu dan waktu terhadap yield dan kandungan senyawa fitokimia dari daun sirih merah yang diekstrak dengan metode air subkritis.
2. Mempelajari pengaruh suhu dan waktu terhadap kemampuan antioksidan dari daun sirih merah.

### **I.5 Manfaat Penelitian**

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan manfaat antara lain:

1. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat menjadi teknologi alternatif untuk ekstraksi daun sirih merah menggunakan air subkritis yang merupakan metode ramah lingkungan dan memerlukan waktu tidak lama dalam proses ekstraksi
2. Dapat menjadi pembanding bagi peneliti lain yang ingin meneliti, mengkaji atau mengembangkan potensi sirih merah

3. Dengan pengetahuan tentang kandungan sirih merah yang lebih luas, diharapkan potensi tanaman sirih merah dapat terus dikembangkan dan populasinya dikembangbiakkan demi menjaga kelestariannya mengingat tanaman ini merupakan tanaman asli Indonesia sangat bermanfaat bagi kesehatan.

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **II.1 Sirih Merah**

Sirih merah adalah tumbuhan merambat yang ditanam karena khasiat pengobatan dan juga keindahan daunnya. Tumbuhan ini masih berkerabat dekat dengan sirih maupun lada. Klasifikasi tanaman sirih merah adalah sebagai berikut :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Subkingdom	: <i>Viridiplantae</i>
Infrakingdom	: <i>Streptophyta</i>
Superdivision	: <i>Embryophyta</i>
Division	: <i>Tracheophyta</i>
Subdivision	: <i>Spermatophytina</i>
Class	: <i>Magnoliopsida</i>
Superorder	: <i>Magnoliana</i>
Order	: <i>Piperales</i>
Family	: <i>Piperaceae</i>
Genus	: <i>Piper L.</i>
Species	: <i>Piper ornatum</i> N.E. Br. – Celebes pepper

(<http://www.itis.gov/hierarchy.html> Diakses pada tanggal 23 Januari 2015)

Batang sirih merah bulat berwarna hijau keunguan dan tidak berbunga. Permukaanya kasar dan bila terkena cahaya akan cepat mengering. Batangnya bersulur dan beruas dengan jarak buku 5-10 cm. Di setiap buku tumbuh bakal akar (Sudewo, 2010). Daunnya bertangkai membentuk jantung dengan bagian atas meruncing, bertepi rata, dan permukaannya mengilap atau tidak berbulu. Panjang daunnya bisa mencapai 15-20 cm. Warna daun bagian atas hijau bercorak warna putih keabu-abuan. Bagian bawah daun berwarna merah hati cerah. Daunnya berlendir, berasa sangat pahit, dan beraroma wangi khas sirih (Sudewo, 2010). Akar daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav)

adalah akar tunggang yang bentuknya bulat dan berwarna coklat kekuningan (Sudewo, 2010).

Tanaman sirih merah tergolong langka karena tidak tumbuh di setiap atau daerah. Sirih merah tidak dapat tumbuh subur di daerah panas. Sementara itu, di tempat berhawa dingin sirih merah dapat tumbuh dengan baik. Jika terlalu banyak terkena sinar matahari, batangnya cepat mengering, tetapi jika disiram secara berlebihan akar batang cepat membusuk. Tanaman sirih merah akan tumbuh dengan baik jika mendapatkan 60-70% cahaya matahari (Sudewo, 2010).



Gambar II.1 Morfologi Tanaman sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz dan Pav). Keterangan: a. Daun; b. Batang

Manfaat zat aktif yang terkandung dalam sirih merah antara lain pencegah ejakulasi dini, antikejang, antiseptik, analgetik, antiketombe, antidiabetes, pelindung hati, anti diare, mempertahankan kekebalan tubuh, dan penghilang bengkak. Daun sirih merah juga mampu mengatasi radang pau-paru, radang tenggorokan, radang pada gusi, radang pada payudara, hidung berdarah dan batuk berdarah (Sudewo, 2010). Tumbuhan yang mengandung senyawa bioaktif antara lain alkaloid, terpenoid, steroid, asetogenin, fenil porpan, dan tannin dapat berfungsi sebagai insektisida. Daun sirih merah dapat digunakan sebagai

insektisida nabati karena memiliki kandungan senyawa fitokimia yakni alkaloid, saponin, tanin dan flavonoid (Manoi, 2007).

Dari hasil kromatogram diketahui daun sirih merah mengandung flavonoid, senyawa polevenolad, tanin, dan minyak atsiri (Sudewo, 2010).

#### 1) Flavonoid

Senyawa-senyawa flavonoid adalah senyawa-senyawa polifenol yang mempunyai 15 atom karbon, terdiri dari dua cincin benzena yang dihubungkan menjadi satu oleh rantai linier yang terdiri dari tiga atom karbon. Senyawa flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, bunga, buah, dan biji. Kebanyakan flavonoid ini berada di dalam tumbuh-tumbuhan, kecuali alg (Doloksaribu, 2011).

#### 2) Saponin

Saponin adalah glikosida triterpena dan sterol dan telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa dan menghemolisis sel darah merah.

#### 3) Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman. Tanin tergolong senyawa polifenol dengan karakteristiknya yang dapat membentuk senyawa kompleks dengan makromolekul lainnya. Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin yang mudah terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin yang mudah terhidrolisis merupakan polimer *gallic* atau *ellagic acid* yang berikatan ester dengan sebuah molekul gula, sedangkan tanin terkondensasi merupakan polimer senyawa flavonoid dengan ikatan karbon-karbon (Westendarp, 2006) (Sofyan, 2008).

#### 4) Minyak atsiri

Minyak atsiri adalah cairan jernih berbau seperti tanaman asalnya. Biasanya terdapat dalam kelenjar minyak, pembuluh-

pembuluh sekresi atau rambut kelenjar dari kelenjar aromatis. Kegunaan minyak atsiri bagi tanaman sendiri adalah menolak kehadiran binatang. kebanyakan minyak atsiri bersifat anti bakteri dan anti jamur yang kuat. Minyak atsiri berperan sebagai antibakteri dengan cara mengganggu proses terbentuknya membran atau dinding sel sehingga tidak terbentuk atau terbentuk tidak sempurna (Juliantina dkk, 2009).

## **II.2 Metode Ekstraksi Daun Sirih Merah**

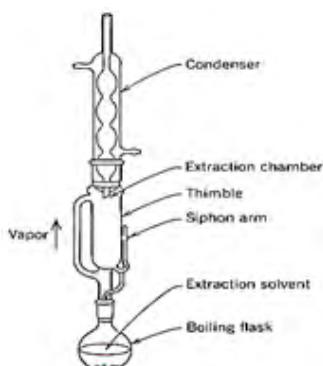
### **1. Maserasi**

Maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada temperatur ruangan. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel sehingga senyawa metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektifitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut. Secara umum pelarut methanol merupakan pelarut yang paling banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa organik bahan alam, karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder.

### **2. Soxhlet extraction**

Metode dengan menggunakan soxhlet ini dijelaskan oleh Soxhlet pada tahun 1879. Contoh metode yang paling umum digunakan metode semi-kontinyu diterapkan untuk ekstraksi lipid dari makanan. Menurut prosedur Soxhlet tersebut, minyak dan lemak dari bahan padat yang diambil dengan mencuci berulang (perkolasi) dengan organik pelarut, biasanya heksana atau petroleum eter, di bawah refluks dalam gelas

khusus. Soxhlet merupakan suatu peralatan yang digunakan untuk mengekstrak suatu bahan dengan pelarutan yang berulang-ulang dengan pelarut yang sesuai. Sampel yang akan diekstraksi ditempatkan dalam suatu timbel yang permeabel terhadap pelarut dan diletakkan di atas tabung destilasi, dididihkan dan dikondensasikan di atas sampel. Kondesat akan jatuh ke dalam timbel dan merendam sampel dan diakumulasi sekeliling timbel. Setelah sampai batas tertentu, pelarut akan kembali masuk ke dalam tabung destilasi secara otomatis. Proses ini berulang terus dengan sendirinya di dalam alat terutama dalam peralatan Soxhlet yang digunakan untuk ekstraksi lipida (Wirakusumah 2007). Prinsip soxhlet ialah ekstraksi menggunakan pelarut yang selalu baru yang umumnya sehingga terjadi ekstraksi kontinyu dengan jumlah pelarut konstan dengan adanya pendingin balik. Metode soxhlet ini dipilih karena pelarut yang digunakan lebih sedikit (efisiensi bahan) dan larutan sari yang dialirkan melalui sifon tetap tinggal dalam labu, sehingga pelarut yang digunakan untuk mengekstrak sampel selalu baru dan meningkatkan laju ekstraksi. Waktu yang digunakan lebih cepat. Kerugian metode ini ialah pelarut yang digunakan harus mudah menguap dan hanya digunakan untuk ekstraksi senyawa yang tahan panas.



Gambar II.2 Rangkaian Alat Ekstraksi Soxhlet



### **3. *Hydrodistillation extraction***

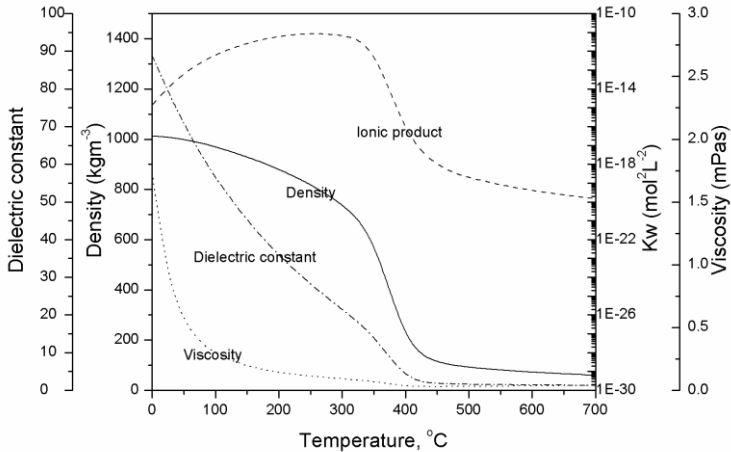
Penyulingan suatu campuran yang berwujud cairan yang tidak saling bercampur, hingga membentuk dua fasa atau dua lapisan. Keadaan ini terjadi pada pemisahan minyak atsiri dengan uap air. Penyulingan dengan uap air sering disebut juga hidrodestilasi. Pengertian umum ini memberikan gambaran bahwa penyulingan dapat dilakukan dengan cara mendidihkan bahan tanaman atau minyak atsiri dengan air. Pada proses ini akan dihasilkan uap air yang dibutuhkan oleh alat penyuling. Uap air tersebut dapat juga dihasilkan dari alat pembangkit uap air yang terpisah.

### **4. *Subcritical water extraction***

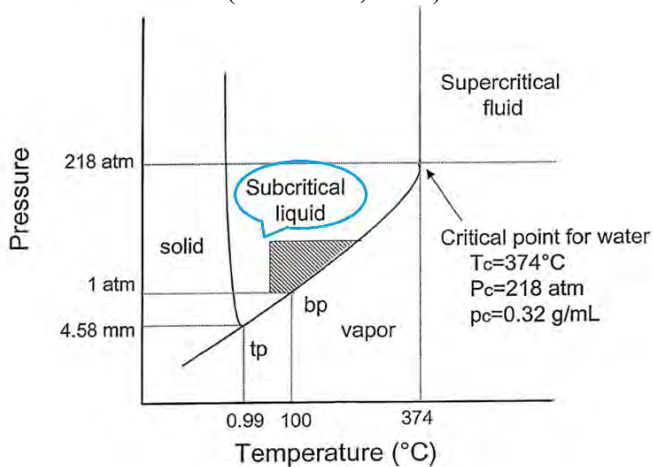
*Subcritical Water Extraction* (ekstraksi dengan air subkritik) disebut pula sebagai *pressurized hot water extraction* atau *superheated water* ( “*near critical water*” atau *high temperature*) *extraction*. Istilah *subcritical water extraction* (*SWE*) yaitu metode ekstraksi dengan air sebagai ekstrakstan pada suhu 100-374 °C dan tekanan cukup tinggi (diatas 1 atm) untuk mempertahankan keadaan air tetap cair (Ayala, 2001). Dalam kondisi seperti ini, ikatan antarmolekul hidrogen dalam air yang rusak, menyebabkan polaritas air menurun. Akibatnya, air menjadi pelarut yang lebih efektif untuk beberapa senyawa organik.

Air memiliki sifat sangat polar, pada kondisi ruang nilai konstanta dielektrik air adalah 80. Sehingga air dikenal tidak bisa mengekstrak komponen-komponen nonpolar/ organik pada suhu ruang. Akan tetapi seperti terlihat pada gambar II.3 dengan semakin meningkatnya suhu, nilai konstanta dielektrik menurun yang diikuti oleh menurunnya kekentalan dan densitas air tetapi meningkatnya difusivitas (Weingartner and Franck, 2005). Sehingga air pada suatu kondisi tertentu bisa memiliki konstanta dielektrik mirip dengan metanol/etanol, misalnya pada 250°C dan 50 bar, konstanta dielektrik ( $\epsilon$ )nya

27 yaitu antara metanol ( $\epsilon=33$ ) dan etanol ( $\epsilon=24$ ) (Weingartner and Franck, 2005).



Gambar II.3 Sifat fisik air sebagai fungsi suhu pada tekanan 250 bar (Ohmori T., 2004)



Gambar II.4 Diagram Fase Air

Mekanisme ekstraksi dengan menggunakan air subkritik dapat dijabarkan dalam langkah-langkah: (Hawthorne et al, 1994; Kronholm et al, 2007; Ong et al, 2006)

1. Desorpsi solut dari berbagai tempat aktif di dalam matrik sampel pada tekanan dan suhu tinggi
2. Difusi pelarut ke matrik
3. Tergantung sampel matrik, solute mungkin memisahkan diri dari sampel matrik ke pelarut dan akhirnya mengalir keluar dari sel ekstraktor dan ditampung dalam vial.

Faktor-faktor utama yang mempengaruhi selektivitas dan efisiensi ekstraksi antara lain suhu, tekanan, waktu ekstraksi dan modifier/aditif.

a. Suhu

Suhu adalah faktor utama yang mempengaruhi efisiensi ekstraksi dan selektivitas dalam ekstraksi dengan air subkritik. Suhu mempengaruhi sifat fisik air dan juga menentukan kekuatan analit pada proses dekomposisi/hidrolisis. Suhu reaksi pada umumnya diatas titik didih air, karena keuntungan-keuntungan seperti difusivitas yang tinggi, viskositas dan tegangan permukaan yang rendah tercapai pada suhu yang relatif tinggi. Naiknya tekanan uap dan cepatnya desorpsi panas senyawa target dapat meningkatkan efisiensi ekstraksi (Budrat and Shotipruk, 2009). Suhu tinggi juga membuat properti air berubah dan membuat kepolaran air makin mendekati komponen nonpolar, sehingga mampu meningkatkan kelarutan senyawa-senyawa kurang polar dalam air. Akan tetapi degradasi komponen dan intensitas reaksi seperti hidrolisis dan oksidasi semakin besar dengan bertambahnya suhu. Komponen-komponen di dalam minyak dari tumbuhan mungkin memiliki sifat nonpolar atau polar dan labil secara thermal. Untuk mengekstrak komponen nonpolar dari tumbuhan, kenaikan suhu sampai 200°C mungkin

diperlukan. Akan tetapi degradasi senyawa target pada suhu tinggi perlu diwaspadai.

b. Tekanan

Tekanan memiliki efek yang kurang signifikan terhadap efisiensi ekstraksi. Efek dari tekanan adalah dalam mengubah fase air. Tekanan rata-rata seperti 15 bar pada 200°C dan 85 bar pada 300°C diperlukan untuk menjaga air tetap pada kondisi cairnya. Contohnya memvariasikan tekanan tidak mengubah recovery minyak esensial dari tanaman obat dan ginsenosides dari ginseng amerika (Deng et. Al, 2004; Deng et. Al, 2005).

c. Waktu ekstraksi

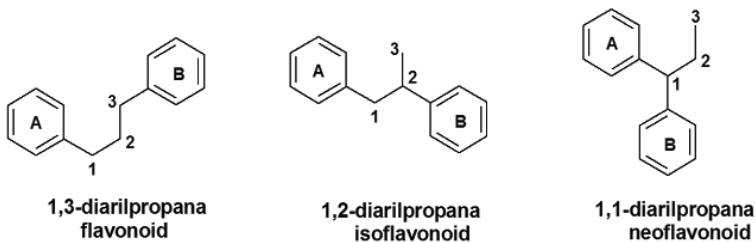
d. Modifier/aditif

Penambahan modifier organik atau nonorganik memungkinkan kenaikan kelarutan komponen di air. Modifier tersebut mungkin mengubah sifat air pada suhu tinggi. Contoh modifier adalah ammonia, ethanol (Mukhopadhyay and Panja, 2008; Arapitras and Turner, 2008).

## II.3 Flavonoid

Flavonoid adalah suatu kelompok senyawa fenol terbesar yang ditemukan di alam. Senyawa-senyawa ini merupakan zat warna merah, ungu dan biru, dan sebagian zat warna kuning yang ditemukan dalam tumbuh-tumbuhan.

Flavonoid mempunyai kerangka dasar karbon yang terdiri dari 15 atom karbon, di mana dua cincin benzene ( $C_6$ ) terikat pada suatu rantai propane ( $C_3$ ) sehingga membentuk suatu susunan  $C_6$ - $C_3$ - $C_6$ . Susunan ini dapat menghasilkan tiga jenis struktur, yakni 1,3-diarilpropan atau flavonoid, 1,2-diarilpropan atau isoflavonoid, dan 1,1-diarilpropan atau neoflavonoid. Ketiga struktur tersebut dapat dilihat pada gambar II.5



Gambar II.5 Struktur Flavonoid, Isoflavonoid, Neoflavonoid

Istilah “flavonoid: yang diberikan untuk senyawa-senyawa fenol ini berasal dari kata flavon, yakni nama dari salah satu jenis flavonoid yang terbesar jumlahnya dan juga lazim ditemukan. Senyawa-senyawa flavon ini mempunyai kerangka 2-fenilkroman, di mana posisi orto dari cincin A dan atom karbon yang terikat pada cincin B dari 1,3-diarilpropana dihubungkan oleh jembatan oksigen, sehingga membentuk suatu cincin heterosiklik yang baru (cincin C).

Senyawa-senyawa flavonoid terdiri atas beberapa jenis, bergantung pada tingkat oksidasi dari rantai propana dan sistem 1,3-diarilpropana. Dalam hal ini, flavan mempunyai tingkat oksidasi yang terendah sehingga senyawa ini dianggap sebagai senyawa induk dalam tatanama senyawa-senyawa turunan flavonoid. Flavonoid terbagi menjadi 4 kelompok, yaitu:

1. Flavan : luteolin, apigenin, tangeritin
2. Flavonol atau 3-hidroksiflavan : kuersetin, kaempferol, myricetin, fisetin, isorhamnetin, pachypodol, rhamnazin
3. Flavanon : hesperetin, naringenin, eriodictyol, homoeriodictyol
4. Flavanonol atau 3-hidroksiflavanon atau 2,3-dihydroflavanon : taksivolin (dihidrokuersetin), dihidrokaempferol

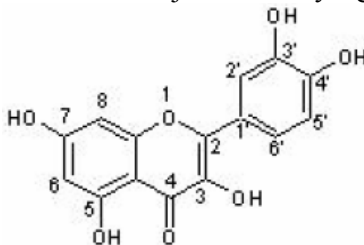
Senyawa-senyawa flavonoid terdapat dalam semua bagian tumbuhan tinggi, seperti bunga, daun, ranting, buah, kayu, kulit kayu dan akar. Akan tetapi, senyawa flavonoid tertentu seringkali terkonsentrasi dalam suatu jaringan tertentu, misalnya antoisanidin adalah zat warna dari bunga, buah, dan daun.

Sebagian besar flavonoid alam ditemukan dalam bentuk glikosida, di mana unit flavonoid terikat pada suatu gula. Flavonoid dapat ditemukan sebagai mono-, di-, atau triglikosida, di mana satu, dua, atau tiga gugus hidroksil dalam molekul flavonoid terikat oleh gula. Poliglikosida larut dalam air dan hanya sedikit larut dalam pelarut-pelarut organik, seperti eter, benzene, kloroform dan aseton.

## II.4 Kuersetin

Kuersetin adalah senyawa kelompok flavonol terbesar, kuersetin dan glikosidanya berada dalam jumlah sekitar 60-75% dari flavonoid. Kuersetin dipercaya dapat melindungi tubuh dari beberapa jenis penyakit degeneratif dengan cara mencegah terjadinya proses peroksidasi lemak. Kuersetin memperlihatkan kemampuan mencegah proses oksidasi dari Low Density Lipoproteins (LDL) dengancara menangkap radikal bebas dan menghelat ion logam transisi.

Ketika flavonol kuersetin bereaksi dengan radikal bebas, kuersetin mendonorkan protonnya dan menjadi senyawa radikal, tetapi elektron tidak berpasangan yang dihasilkan didelokasi oleh resonansi, hal ini membuat senyawa kuersetin radikal memiliki energi sangat rendah untuk menjadi radikal yang reaktif.



Gambar II.6 Struktur Kuersetin

Tiga gugus dari struktur kuersetin yang membantu dalam menjaga kestabilan dan bertindak sebagai antioksidan ketika bereaksi dengan radikal bebas antara lain:

1. Gugus O-dihidroksil pada cincin B
2. Gugus 4-oxo dalam konjugasi dengan alkena 2,3

### 3. Gugus 3- dan 5- hidroksil

Gugus fungsi tersebut dapat mendonorkan elektron kepada cincin yang akan meningkatkan jumlah resonansi dari struktur benzene senyawa kuersetin.

Para ilmuwan telah melakukan penelitian untuk mengidentifikasi dan mengetahui berbagai jenis kandungan flavonol dari berbagai jenis makanan. Konsentrasi tertinggi flavonoid ditemukan dalam sayuran seperti bawang dan brokoli, dalam buah seperti apel, ceri, beri, dan pada minuman seperti anggur merah.

## **II.5 Antioksidan**

Antioksidan adalah substansi yang diperlukan oleh tubuh untuk menetralkan radikal bebas dan mencegah kerusakan yang ditimbulkan oleh radikal bebas terhadap sel normal, protein dan lemak. Antioksidan menstabilkan radikal bebas dengan melengkapi kekurangan elektron yang dimiliki radikal bebas, dan menghambat terjadinya reaksi berantai dari pembentukan radikal bebas yang dapat menimbulkan stres oksidatif. Ada beberapa bentuk antioksidan, di antaranya vitamin. Mineral dan fitokimia. Beberapa tipe antioksidan bekerja bersama dalam melindungi sel normal dan menetralkan radikal bebas. Antioksidan adalah suatu inhibitor yang bekerja menghambat oksidasi dengan cara bereaksi dengan radikal bebas reaktif membentuk radikal bebas tak reaktif yang relatif stabil.

Radikal bebas adalah atom atau molekul yang tidak stabil dan sangat reaktif karena memiliki satu atau lebih elektron tak berpasangan pada orbital terluarnya. Untuk mencapai kestabilan atom atau molekul, radikal bebas akan bereaksi dengan molekul di sekitarnya untuk memperoleh pasangan elektron. Reaksi ini akan berlangsung terus menerus dalam tubuh dan bila tidak dihentikan akan menimbulkan berbagai penyakit seperti kanker, jantung, katarak, penuaan dini serta penyakit degeneratif lainnya. Oleh karena itu, tubuh memerlukan suatu substansi penting yaitu

antioksidan yang mampu menangkal radikal bebas tersebut sehingga tidak menimbulkan suatu penyakit.

Dari sejumlah penelitian pada tanaman obat dilaporkan bahwa banyak tanaman obat yang mengandung antioksidan dalam jumlah besar. Efek antioksidan terutama disebabkan karena adanya senyawa fenol seperti flavonoid dan asam fenolat. Biasanya senyawa-senyawa yang memiliki aktivitas antioksidan adalah senyawa fenol yang mempunyai gugus hidroksi tersubstitusi pada posisi orto dan para terhadap gugus  $-OH$  dan  $-OR$ .

## II.6 Penelitian Terdahulu

Penelitian dengan judul “*Subcritical Water Extraction of Flavonol Quercetin from Onion Skin*” yang dilakukan oleh Jung Ko dkk. (2011) bertujuan untuk meneliti penggunaan ekstraksi air subkritis kuersetin dari kulit bawang dan mengevaluasi pengaruh kondisi operasi kunci dengan melakukan variasi suhu ( $100-190^{\circ}C$ ), waktu ekstraksi (5–30 menit), dan rasio pencampuran kulit bawang dengan *diatomaceous earth* (DE) (0,5:3,5–2:2) di bawah tekanan tinggi (90–131bar). Yield kuersetin tertinggi ( $16.29 \pm 0.75$  mg/g kulit bawang) diperoleh pada suhu ekstraksi  $165^{\circ}C$ , waktu ekstraksi 15 menit, rasio pencampuran 1,5 : 2,5 untuk kulit bawang dan DE. Ekstraksi air subkritis dibandingkan dengan tiga metode ekstraksi konvensional dalam hal efisiensi. Yield kuersetin dari ekstraksi air subkritis lebih banyak delapan, enam, dan empat kali lipat daripada ekstraksi konvensional menggunakan etanol, metanol, and metode ekstraksi air pada titik didih.

Penelitian dengan judul “*Subcritical Water Extraction of Nutraceuticals With Antioxidant Activity from Oregano*” dilakukan oleh Meizoso dkk. Ekstraksi antioksidan dari daun oregano menggunakan air subkritis dilakukan pada suhu yang berbeda (25, 50, 100, 150 and  $200^{\circ}C$ ) untuk menguji selektivitas proses. Hasilnya disimpulkan bahwa pada suhu  $200^{\circ}C$  yield ekstraksi mencapai nilai tertinggi (54% berat kering).



Penelitian telah dilakukan oleh Serlahwaty (2011) dengan judul “Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Etanol 70% Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.) dan Sirih Merah (*Piper crocatum*)” dengan metode peredaman radikal bebas DPPH. Hasil penelitian menunjukkan aktivitas antioksidan dari ekstrak etanol 70% daun sirih merah, ekstrak air daun sirih hijau, dan ekstrak daun sirih merah, berturut-turut dengan nilai  $IC_{50}$  10,59  $\mu\text{g/mL}$ , 28,05  $\mu\text{g/mL}$ , 36,02  $\mu\text{g/mL}$ , dan 60,35  $\mu\text{g/mL}$ .

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **III.1 Bahan dan Peralatan yang Digunakan**

- **Bahan**
  1. Daun Sirih Merah
  2. Aquadest
  3. Methanol
  4. n - Hexane
  5. Es Batu
- **Peralatan**
  1. Timbangan analitik
  2. Reaktor *Hydrothermal*
  3. Erlenmeyer
  4. Gelas ukur
  5. Seperangkat *rotary vacuum evaporator*
  6. Kertas saring
  7. Corong
  8. Pipet tetes
  9. Gelas arloji
  10. Botol kaca

#### **III.2 Variabel Penelitian**

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Variabel Tetap
  1. Daun Sirih Merah
  2. Ratio daun sirih merah : aquadest dengan perbandingan solid : liquid adalah 3 : 18.
- Variabel Kontrol
  1. Suhu ekstraksi 100°C, 150°C, 200°C, 250°C, 300°C
  2. Waktu ekstraksi 5 menit, 10 menit, 15 menit, 20 menit, 25 menit.

- Variabel Respon
  1. Yield dan kandungan senyawa fitokimia yang diperoleh.
  2. Kemampuan antioksidan dari senyawa fitokimia yang diperoleh.

### **III.3 Prosedur Penelitian**

#### **III.3.1 Persiapan Bahan**

Sirih merah segar dipisahkan bagian daun dan ranting. Daun sirih merah kemudian ditumbuk hingga menjadi ukuran kecil-kecil dan diitimbang sebanyak 3 gram.

#### **III.3.2 Ekstraksi Daun Sirih Merah dengan Maserasi**

Bahan sebanyak 3 gram yang sudah dihaluskan, dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan pelarut methanol dan n-heksan dengan rasio 3 gram daun sirih dibanding 18 ml pelarut. Maserasi dilakukan selama 3 hari. Setelah 3 hari hasil maserasi disaring dengan *vacuum pump* dan dipisahkan hasil ekstraksi dari pelarutnya dengan *rotary evaporator*. Untuk menghilangkan sisa pelarut, ekstrak dioven pada suhu 60°C hingga diperoleh berat konstan.

#### **III.3.3 Ekstraksi Daun Sirih Merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav) dengan Air Subkritis**

Pada penelitian ini, sebanyak 3 gram daun sirih merah yang sudah dihaluskan dimasukan ke dalam reaktor *Hydrothermal* yang berbentuk *tube* dengan ID = 1,69 inch, dan tebal 0,215 cm. Kemudian, ditambahkan pelarut aquades sebanyak 18 ml. Selanjutnya reaktor dimasukkan kedalam *furnace* yang telah diatur suhunya sesuai dengan variable yaitu 100;150;200;250;300°C. Reaktor ditunggu sampai 20 menit pertama dengan asumsi agar suhu reaktor sama dengan suhu furnace. Kemudian dilanjutkan waktu ekstraksi sesuai dengan variabel yaitu

5;10;15;20;25 menit. Dalam penelitian ini suhu di dalam reaktor dianggap sama dengan suhu didalam furnace, hal ini karena bahan reaktor berupa *stainless steel* yang merupakan penghantar panas yang baik. Fase pelarut didalam reaktor pada saat suhu 100;150;200;250;300°C berada dalam kondisi vapor dan tekanan di dalam reaktor mengikuti tekanan uap dari aquades dan berada dalam kondisi air subkritis. Kondisi tekanan di dalam reaktor dapat disimulasikan dengan menggunakan Hysys dan diperoleh hasil kondisi saat suhu 100; 150; 200; 250; 300°C berturut-turut adalah 1; 4,69; 15,24; 38,62; 85,84 atm. Kondisi ini sesuai dengan kondisi penelitian recovery minyak esensial dari tanaman obat dan ginsenosides dari ginseng amerika (Deng et. Al, 2004; Deng et. Al, 2005). Hasil ekstraksi yang telah dikeluarkan dari reaktor dan didinginkan secara mendadak lalu dipisahkan antara padatan dan larutan ekstrak dengan menggunakan kertas saring sehingga didapatkan padatan dan cairan. Untuk membersihkan sisa daun sirih merah yang masih tertinggal di dalam reaktor, reaktor dibilas dengan 2 mL aquades. Kemudian, cairan dipisahkan antara ekstrak dari pelarutnya agar diperoleh hasil ekstrak murni dengan memasukkannya ke dalam oven pada suhu 100°C. Setelah didapat ekstrak dengan berat konstan, ekstrak dikeluarkan dari oven dan dianalisa kandungan senyawa fitokimia dan aktivitas antioksidannya.

### **III.4 Metode Analisa**

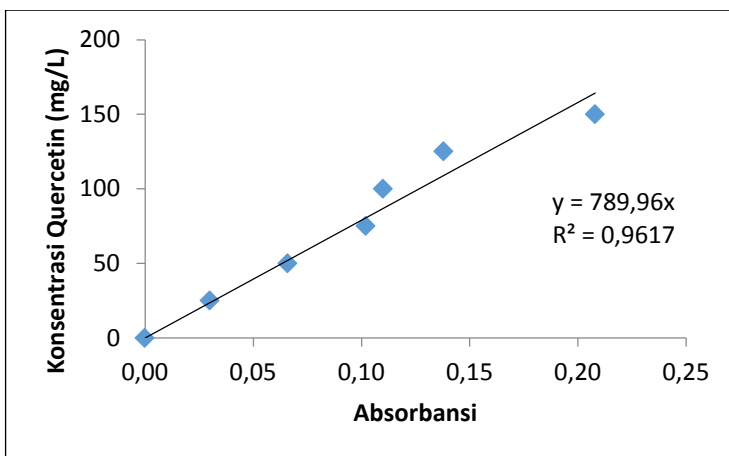
#### **III.4.1 Analisa Kandungan Senyawa Fitokimia**

Pada penelitian ini analisa dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan metode Aluminium Complexation ( $AlCl_3$ ) Reaction.

Spektrofotometri UV-Vis merupakan salah satu teknik analisis spektroskopi yang memakai sumber radiasi elektromagnetik dekat (190-380) dan sinar tampak

(380-780) dengan memakai instrument spektrofotometer (Muljadan Suharman, 1995). Spektrofotometer terdiri atas spectrometer dan fotometer. Spektrofotometer menghasilkan sinar dari spectrum dengan panjang gelombang tertentu dan fotometer adalah alat pengukur intensitas cahaya yang ditranmisikan atau yang diabsorpsi. Spektrofotometer tersusun atas sumber spectrum yang kontinyu, monokrom, sel pengabsorpsi untuk larutan sampel atau blangko dan suatu alat untuk mengukur perbedaan antara sampel dan blangko pembanding. Hasil ekstraksi daun sirih merah yang telah murni dianalisa senyawa fitokimia dengan cara mengukur serapannya menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjanggelombang 415 nm.

Analisa diawali dengan membuat larutan  $\text{AlCl}_3$  (0,5 mL, 2%, w/v) dan ditambahkan pada 1 mL larutan kuersetin atau ekstrak daun sirih merah kemudian dicampur dengan 0,5 mL air, 0,5 mL HCl, dan 0,5 mL  $\text{CH}_3\text{COONa}$ . Selanjutnya divortex agar larutan lebih homogen, dan disimpan dalam suhu ruang selama 10 menit. Kemudian dilakukan spektrofotometri pada panjang gelombang 415 nm. Hasil dari absorbansi larutan standard kuersetin dibuat dalam bentuk grafik linear sehingga diperoleh nilai regresi hubungan antara konsentrasi kuersentin (mg/L) versus absorbansi.



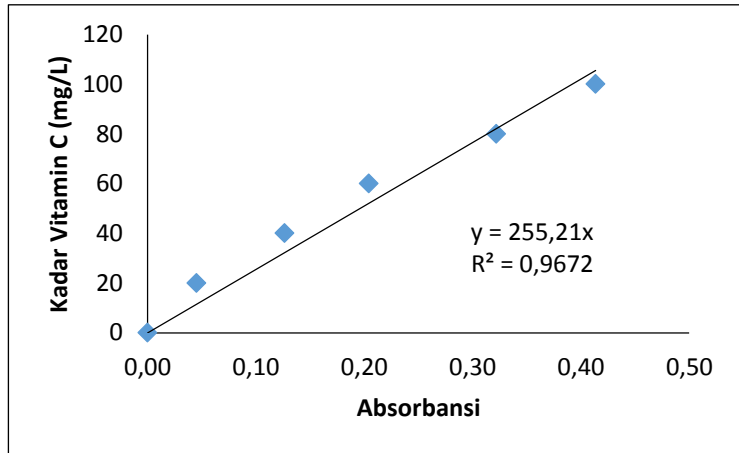
**Grafik III.1**Kurva Standard Kuersetin

### III.4.2Analisa Kemampuan Antioksidan

Pada penelitian ini analisa kemampuan antioksidan dilakukan menggunakan Metode Efek Peredaman terhadap Radikal Bebas DPPH (*1,1-diphenyl-2-picrylhidrazil*).

Prinsip pengujian aktivitas antioksidan dengan metode DPPH yaitu ketika larutan DPPH bercampur dengan senyawa yang dapat mendonorkan atom hidrogen (zat antioksidan), maka DPPH akan tereduksi dan kehilangan warna ungunya. Membuat larutan standard vitamin C dan dilakukan 5 kali pengenceran sehingga diperoleh larutan standard dengan konsentrasi: 20, 40, 60, 80, 100 mg/L. Menyiapkan 6 tabung reaksi yang bersih dan mengisi masing-masing dengan 0,1 mL larutan standard kemudian diencerkan sampai 2 mL dengan metanol. Menambahkan 2 mL DPPH 35 µg/mL pada masing-masing tabung kemudian mendinginkan larutan pada suhu ruang dan tempat gelap selama 30 menit. Setelah itu melakukan analisa menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm untuk

memperoleh absorbansi masing-masing larutan standar. Membuat kurva seperti pada Grafik III.2 di bawah yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi larutan standar dan absorbansi.



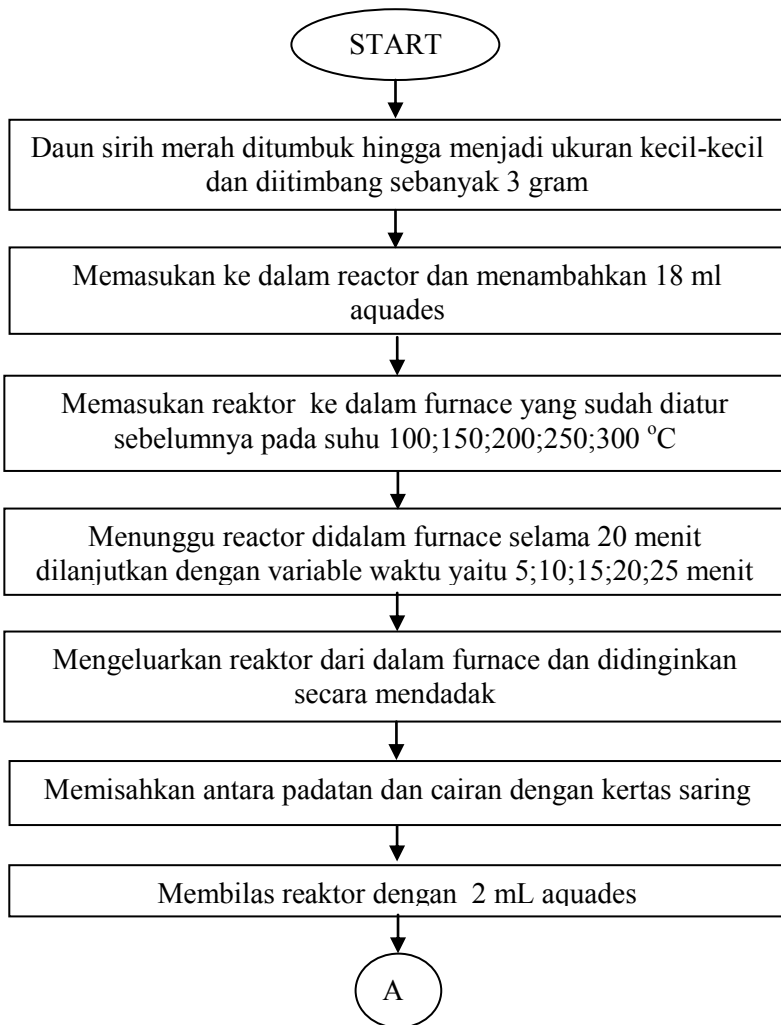
**Grafik III.2** Kurva Standard Vitamin C

Parameter untuk menginterpretasikan hasil pengujian dengan metode DPPH adalah  $IC_{50}$  (*Inhibition Concentration*).  $IC_{50}$  merupakan konsentrasi larutan substrat atau sampel yang akan menyebabkan reduksi terhadap aktivitas DPPH sebesar 50%. Dari serapan yang dihasilkan dapat dihitung nilai peredaman radikal bebas (%) dengan rumus sebagai berikut:

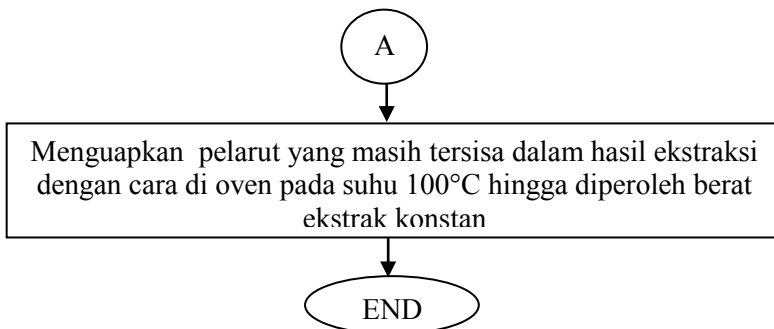
$$\frac{\text{Serapan Blanko} - \text{serapan sampel}}{\text{Serapan Blanko}} \times 100\%$$

Semakin kecil nilai  $IC_{50}$  berarti semakin tinggi aktivitas antioksidan. Secara spesifik suatu senyawa dikatakan sebagai antioksidan sangat kuat jika nilai  $IC_{50}$  kurang dari 0,05 mg/ml, kuat untuk  $IC_{50}$  antara 0,05-0,1 mg/ml, sedang jika  $IC_{50}$  bernilai 0,101-0,150 mg/ml, dan lemah jika  $IC_{50}$  bernilai 0,150-0,200 mg/ml.

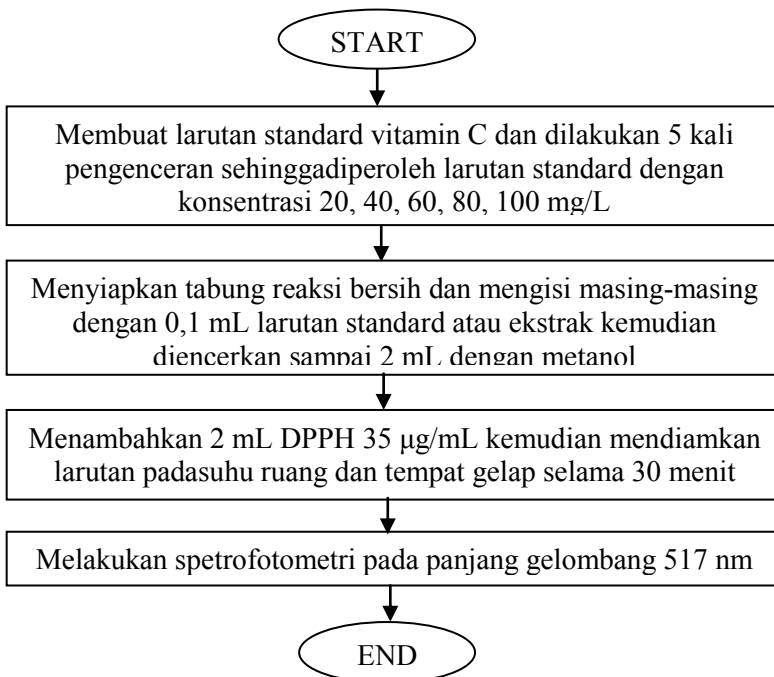
### III.5 Diagram Alir Penelitian







**Gambar III.1** Diagram Alir Ekstraksi Daun Sirih Merah



**Gambar III.2** Diagram Alir Analisa Antioksidan Ekstrak Daun Sirih Merah

## **BAB V**

### **KESIMPULAN**

Dari penelitian ekstraksi daun sirih merah (*Piper crocatum* Ruiz & Pav.) menggunakan air subkritis yang telah dilakukan dapat diambil kesimpulan bahwa:

1. Yield tertinggi diperoleh pada suhu 200°C saat waktu 20 menit yaitu sebesar  $9,13 \pm 0,707\%$ .
2. Kadar flavonoid tertinggi diperoleh pada suhu 200°C saat waktu 15 menit yaitu sebesar  $282,411 \pm 0,559$  mg flavonoid/g ekstrak.
3. Yield ekstrak daun sirih merah meningkat pada suhu 100 - 250°C dan menurun pada suhu 300°C , serta meningkat saat waktu 5 – 20 menit lalu mengalami penurunan saat waktu 25 menit.
4. Kadar flavonoid dari daun sirih merah meningkat saat suhu 100 - 200°C dan menurun saat suhu 250°C, serta meningkat saat waktu 5 – 15 menit lalu mengalami penurunan saat waktu 20 menit.
5. Kondisi terbaik untuk melakukan ekstraksi daun sirih merah dengan air subkritis adalah pada suhu 200°C dalam waktu 15-20 menit.
6. Aktivitas antioksidan tertinggi dari ekstrak daun sirih merah adalah pada suhu 200°C saat waktu 20 menit yaitu  $100,443 \pm 0,54$  mg vitamin C/L dengan nilai  $IC_{50}$  pada suhu 200 °C adalah 6,306 µg/mL.
7. Aktivitas antioksidan ekstrak daun sirih merah meningkat pada suhu 100 - 200°C dan menurun pada suhu 250°C , serta meningkat saat waktu 5 – 20 menit lalu mengalami penurunan saat waktu 25 menit.

## DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, A. (2000). *Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia* (Hal. 29, 91, 111). Bandung: Penerbit ITB.
- Ayala, R.S.& Luquede Castro, M.D.(2001).Continuous Subcritical Water Extraction As A Useful Tool ForIsolation Of Edible Essential Oils.*Food Chem.*, 75, 109-113.
- Deng, C., Li, N.& Zhang, X. (2004). Rapid Determination Of Essential Oil In Acorus TatarinowiiSchott. By Pressurized Hot Water Extraction Followed By Solid-Phase Microextraction And Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography, A*(1059), 149-155.
- Deng, C., Yao, N., Wang, A. & Zhang, X. (2005). Determination Of Essential Oil In A Traditional Chinese Medicine, Fructus Amomi By Pressurized Hot Water Extraction Followed By Liquid-Phase Microextraction And Gas Chromatography Mass Spectrometry.*Analytica Chimica Acta*,536, 237-244.
- Doloksaribu, R. (2009). *Isolasi Senyawa Flavonoid Dari Daun Tumbuhan Harimonting*. Medan: Universitas Sumatera Utara.
- Gritter, R., J.(1991).*Pengantar Kromatografi*. Bandung: ITB Press.
- Hawthorne, S. B , Yang, Y. and Miller, D. J. (1994). Extraction of Organic Pollutants from Environmental Solids with Sub- and Supercritical Water. *Analytical Chemistry*, 66, 2912-2920.
- Irawan, C. (2009). *Uji Aktivitas Antioksidan Senyawa Bioaktif Dalam Daun Sirih Merah (Piper crocatum Ruiz & Pav)*. Bogor: Warta Puslitbangbun Vol.22.
- Irawan, C. (2010). *Studi Komponen Bioaktif Daun Sirih Merah(Piper cf. arcuatum Blume)*. Depok: Universitas Indonesia.

- Jain, C., Singh, A., Kumar, P. & Gautam, K. (2014). Anti-Diabetic Potential of Flavonoids and Other Crude Extracts of Stem Bark of *Mangifera Indica* Linn: A Comparative Study. *Journal of Scientific and Innovative Research*, 3(1), 21-27.
- Juliantina, R. F., Citra M., D.A., Nirwani, B., Nurmasitoh, T. & Bowo, E. (2009). Manfaat Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Agen Anti Bakterial Terhadap Bakteri Gram positif dan Gram Negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia*.
- Ko, M.J., Cheigh, C.I., Cho, S.W., Chung, M.S. Subcritical Water Extraction of Flavonol Quercetin from Onion Skin. *Journal of Food Engineering*. Volume 102(4). 327-333
- Manoi, Feri. 2007. "Sirih Merah Sebagai Tanaman Multi Fungsi". *Warta Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Industri*, 13(2), Agustus 2007.
- McNair, H.M., dan Bonelli, E.J. (1968). *Basic Gas Chromatography. Fifth Edition. Penerjemah: Kosasih Padmawinata. (1988). Dasar Kromatografi Gas. Edisi V.* Bandung: Penerbit ITB. Hal. 12-13
- Meizoso, R., Marin, F.R., Herreeo, M., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibáñez, A. Subcritical Water Extraction of Nutraceuticals with Antioxidant Activity from Oregano. Chemical and Functional Characterization.
- Pekal, Anna. 2014. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analysis Journal Springerlink*
- Rohman, A. 2007. *Kimia Analisis Farmasi*. Yogyakarta: Pustaka Pelajar
- Serlahwaty, Diana. 2011. Aktivitas Antioksidan Ekstrak Air dan Etanol 70% Daun Sirih Hijau dan Sirih Merah dengan Metode Peredaman Radikal Bebas DPPH. *Jurnal Kefarmasian* Volume 9. Hal 143-146
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., dan Morrill, T.C. (1986). *Laboratory Investigation in Organic Chemistry*.

- Penerjemah: Hartono. Penyidikan Spektrometrik Senyawa Organik*. Jakarta: Erlangga. Hal. 3-81, 305-308.
- Sofyan, A. & Jayanegara, A. (2008). Penentuan Aktivitas Biologis Tanin Beberapa Hijauan Secara In Vitro Menggunakan „Hohenheim Gas Test“ dengan Polietilen Glikon Sebagai Determinan. *Jurnal Media Peternakan*, 1.31(1)
- Sudewo, Bambang. (2010). *Basmi Penyakit Dengan Sirih Merah*. Jakarta: Agromedia Pustaka.
- Supratman, U. (2010). Elusidasi Struktur Senyawa Organik. Bandung: Widya Padjadjaran.
- Wachidah, L. N. 2013. *Uji Aktivitas Antioksidan serta Penentuan Kandungan Fenolat Dan Flavonoid Total Dari Buah Parijoto*. Jakarta: UIN Syarif Hidayatullah.
- Weingartner, H. and Franck, E. U. (2005). *Supercritical Water as a Solvent*. *Angewandte Chemie International Edition* 44, 2672-2692.
- Zuhra, C. F. 2008. Aktivitas Antioksidan Senyawa Flavonoid Dari Daun Katuk. *Jurnal Biologi Sumatera*. Volume 3 No 1. Hal 7-10.

## APPENDIKS A

### PERHITUNGAN YIELD EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH

1. Menghitung yield ekstrak daun sirih merah pada RUN 1  
Perhitungan menggunakan rumus :

\_\_\_\_\_

Di mana berat bahan = 3 gram

- Pada  $T = 100^{\circ}\text{C}$  dan  $t = 5$  menit

\_\_\_\_\_

Yield \_\_\_\_\_

Yield = 2,303%

Perhitungan dengan cara yang sama dilakukan untuk variabel selanjutnya sehingga diperoleh hasil sebagai berikut.

Tabel A.1 Yield Ekstrak Daun Sirih Merah pada RUN 1

Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	Waktu (menit)	Berat Produk (g)	Yield (%)
100	5	0,0691	2,303
	10	0,1202	4,007
	15	0,1236	4,120
	20	0,1491	4,970
	25	0,0548	1,827
150	5	0,0739	2,463
	10	0,0867	2,890
	15	0,1677	5,590
	20	0,2325	7,750
	25	0,0385	1,283
200	5	0,251	8,367
	10	0,2551	8,503

	15	0,2847	9,490
	20	0,2889	9,630
	25	0,2692	8,973
250	5	0,0397	1,323
	10	0,046	1,533
	15	0,0444	1,480
	20	0,1231	4,103
	25	0,0803	2,677
300	5	0,1027	3,423
	10	0,0854	2,847
	15	0,076	2,533
	20	0,0726	2,420
	25	0,0502	1,673

2. Menghitung yield ekstrak daun sirih merah pada RUN 2  
Perhitungan menggunakan rumus :

---

Di mana berat bahan = 3 gram

- Pada  $T = 100^{\circ}\text{C}$  dan  $t = 5$  menit

---



---

Yield = 2,943%

Perhitungan dengan cara yang sama dilakukan untuk variabel selanjutnya sehingga diperoleh hasil sebagai berikut.

Tabel A.2 Yield Ekstrak Daun Sirih Merah pada RUN 2

Suhu ( $^{\circ}\text{C}$ )	Waktu (menit)	Berat Produk (g)	Yield (%)
100	5	0,0883	2,943
	10	0,1101	3,670

	15	0,1252	4,173
	20	0,208	6,933
	25	0,0548	1,827
150	5	0,104	3,467
	10	0,1066	3,553
	15	0,164	5,467
	20	0,2192	7,307
	25	0,1205	4,017
200	5	0,2257	7,523
	10	0,2332	7,773
	15	0,2546	8,487
	20	0,2589	8,630
	25	0,1046	3,487
250	5	0,064	2,133
	10	0,08774	2,925
	15	0,1624	5,413
	20	0,2535	8,450
	25	0,0634	2,113
300	5	0,0945	3,150
	10	0,0757	2,523
	15	0,0743	2,477
	20	0,1127	3,757
	25	0,0581	1,937

Tabel A.3 Yield Ekstrak Daun Sirih Merah Rata-rata

Suhu (°C)	Waktu (menit)	Yield (%)
100	5	2,623 ± 0,453
	10	3,838 ± 0,238
	15	4,147 ± 0,038



	20	$5,952 \pm 0,388$
	25	$2,520 \pm 0,981$
150	5	$2,965 \pm 0,709$
	10	$3,222 \pm 0,469$
	15	$5,528 \pm 0,087$
	20	$7,528 \pm 0,313$
	25	$2,650 \pm 0,933$
200	5	$7,945 \pm 0,596$
	10	$8,138 \pm 0,516$
	15	$8,988 \pm 0,709$
	20	$9,130 \pm 0,707$
	25	$6,230 \pm 0,880$
250	5	$1,728 \pm 0,573$
	10	$2,229 \pm 0,984$
	15	$3,447 \pm 0,781$
	20	$6,277 \pm 0,074$
	25	$2,395 \pm 0,398$
300	5	$3,287 \pm 0,193$
	10	$2,685 \pm 0,229$
	15	$2,505 \pm 0,040$
	20	$3,088 \pm 0,945$
	25	$1,343 \pm 0,250$

## APPENDIKS B

### PERHITUNGAN KADAR FLAVONOID DARI EKSTRAK DAUN SIRIH MERAH

#### B.1 Pembuatan Larutan Standard (Kuersetin) dan Kurva Kalibrasi

Tabel B.1 Absorbansi Larutan Standard

Konsentrasi Kuersetin (ppm)	Absorbansi
0	0,000
25	0,030
50	0,066
75	0,102
100	0,110
125	0,138
150	0,208
175	0,280
200	0,390

Persamaan garis linear:

$$y = 789,96 x$$

$$R^2 = 0,9617$$

Dimana, y = konsentrasi (mg/L)

x = absorbansi

Untuk mencari kadar flavonoid (mg kuersetin/ g ekstrak) digunakan persamaan :

$$\text{Kadar Flavonoid} = \text{konsentrasi flavonoid (mg/L)} \times \text{faktor pengenceran}$$

#### B.2 Perhitungan Kadar Senyawa Flavonoid pada Ekstrak Hasil Maserasi

- Dengan Pelarut Methanol

Absorbansi = 0,617

$$y = 789,96 x$$

$$y = 789,96 \times 0,617 = 487,518 \frac{mg}{L}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar Flavonoid} &= 487,518 \text{ mg/L} \times 0,5 \\ &= 243,759 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

- Dengan Pelarut n-Heksan

$$\text{Absorbansi} = 0,324$$

$$y = 789,96 x$$

$$y = 789,96 \times 0,324 = 128,029 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \times 0,5$$

$$= 128,0299 \text{ mg/L}$$

$$\begin{aligned}\text{Kadar Flavonoid} &= 128,0299 \text{ mg/L} \times 0,5 \\ &= 64,015 \text{ mg/L}\end{aligned}$$

### B.3 Perhitungan Total Kadar Flavonoid pada Ekstrak Hasil Ekstraksi Subkritis

- Pada Suhu 100°C

Run 1

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,124	97,9550	48,978
10	0,270	213,2892	117,309
15	0,393	310,4543	170,750
20	0,283	223,5587	122,957
25	0,249	196,7000	108,185

Run 2

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,131	103,4848	51,742
10	0,283	223,5587	111,779
15	0,442	349,1623	174,581
20	0,280	221,1888	110,594
25	0,246	194,3302	97,165

Waktu (menit)	Kadar Flavonoid Rata-rata (mg flavonoid/g ekstrak)
5	50,360±0,955
10	114,544±0,910
15	172,666±0,709
20	116,776±0,742
25	102,675±0,792

- Pada Suhu 150°C

Run 1

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,239	188,8004	94,400
10	0,404	319,1438	159,572
15	0,461	364,1716	182,086
20	0,446	352,3222	176,161
25	0,308	243,3077	121,654

Run 2

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,235	185,6406	92,820
10	0,422	333,3631	166,682
15	0,460	363,3816	181,691
20	0,445	351,5322	175,766
25	0,337	266,2165	133,108

Waktu (menit)	Kadar Flavonoid Rata-rata (mg flavonoid/g ekstrak)
5	93,610±0,117
10	163,127±0,027

15	181,888±0,279
20	175,964±0,279
25	127,381±0,099

- Pada Suhu 200°C

Run 1

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,168	132,7133	66,357
10	0,520	410,7792	205,390
15	0,716	565,6114	282,806
20	0,698	551,3921	275,696
25	0,304	240,1478	120,074

Run 2

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,186	146,9326	73,466
10	0,534	421,8386	210,919
15	0,714	564,0314	282,016
20	0,696	549,8122	274,906
25	0,302	238,5679	119,284

Waktu (menit)	Kadar Flavonoid Rata-rata (mg flavonoid/g ekstrak)
5	69,911±0,027
10	208,154±0,910
15	282,411±0,559
20	275,301±0,559
25	119,679±0,559

- Pada Suhu 250°C

Run 1

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
	Run 1	Run 1	Run 1
5	0,168	132,7133	66,357
10	0,292	230,6683	115,334
15	0,444	350,7422	175,371
20	0,308	243,3077	121,654
25	0,220	173,7912	86,896

Run 2

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,186	146,9326	73,466
10	0,290	229,0884	114,544
15	0,442	349,1623	174,581
20	0,305	240,9378	120,469
25	0,219	173,0012	86,501

Waktu (menit)	Kadar Flavonoid Rata-rata (mg flavonoid/g ekstrak)
5	69,911±0,027
10	114,939±0,559
15	174,976±0,559
20	121,061±0,838
25	86,698±0,279

- Pada Suhu 300°C

Run 1

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,249	196,7000	26,464
10	0,308	243,3077	74,651
15	0,304	240,1478	102,695
20	0,220	173,7912	104,670
25	0,132	104,2747	52,137

Run 2

Waktu (menit)	Absorbansi	Konsentrasi (ppm)	Kadar Flavonoid (mg flavonoid/g ekstrak)
5	0,064	50,5574	25,279
10	0,198	156,4121	78,206
15	0,264	208,5494	104,275
20	0,263	207,7595	103,880
25	0,130	102,6948	51,347

Waktu (menit)	Kadar Flavonoid Rata-rata (mg flavonoid/g ekstrak)
5	25,871±0,838
10	76,429±0,514
15	103,485±0,117
20	104,275±0,559
25	51,742±0,559

## APPENDIKS C

### PERHITUNGAN AKTIVITAS ANTIOKSIDAN DENGAN METODE EFEK PEREDAMAN TERHADAP RADIKAL BEBAS DPPH

#### C.1 Pembuatan Larutan Standard (Vitamin C) dan Kurva Kalibrasi

$$V1 \times M1 = V2 \times M2$$

$$0,1 \text{ L} \times 1000 \text{ mg} = V2 \times 20 \text{ mg}$$

$$V2 = 50 \text{ ml}$$

#### C.2 Pembuatan Kurva Standard (Vitamin C) dan Kurva Kalibrasi

Tabel C.1 Pengenceran larutan standar dan absorbansi

Konsentrasi (mg/L)	Absorbansi
0	0,000
20	0,045
40	0,126
60	0,204
80	0,322
100	0,414

Persamaan garis linear:

$$y = 255,21 x$$

$$R^2 = 0,9672$$

Dimana, y = konsentrasi (mg/L)

x = absorbansi

#### C.3 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Efek Peredaman terhadap Radikal Bebas DPPH pada Hasil Maserasi

➤ Dengan Pelarut Methanol

$$\text{Absorbansi} = 0,44$$

$$y = 255,21 x$$

$$y = 255,21 \times 0,44 = 112,292 \frac{\text{mg}}{\text{L}}$$



- Konsentrasi n-heksan

Absorbansi = 0,112

$y = 255,21 \times$

$$y = 255,21 \times 0,112 = 28,547 \frac{mg}{L}$$

#### C.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode Efek Peredaman terhadap Radikal Bebas DPPH pada Hasil Ekstraksi Subkritis

Misal pada  $T = 100^{\circ}C$

Absorbansi = 0,074

$y = 255,21 \times$

$$y = 255,21 \times 0,074 = 18,776 \frac{mg}{L}$$

Untuk variabel selanjutnya dilakukan perhitungan dengan cara yang sama.

- Pada  $t = 5$  menit

Run 1

Suhu ( $^{\circ}C$ )	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,074	18,776
150	0,122	31,099
200	0,237	60,448
250	0,094	23,917
300	0,064	16,443

Run 2

Suhu ( $^{\circ}C$ )	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,070	17,938
150	0,120	30,662
200	0,235	59,865
250	0,092	23,589
300	0,060	15,386

Suhu (°C)	Konsentrasi Rata-rata (mg Vitamin C /L)
100	18,357±0,593
150	30,880±0,309
200	60,157±0,412
250	23,753±0,232
300	15,914±0,748

➤ Pada t = 10 menit

Run 1

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C /L)
100	0,154	39,412
150	0,205	52,427
200	0,323	82,433
250	0,184	47,032
300	0,093	23,844

Run 2

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C /L)
100	0,152	38,719
150	0,202	51,516
200	0,320	81,777
250	0,182	46,448
300	0,090	23,042

Suhu (°C)	Konsentrasi Rata-rata (mg Vitamin C/L)
100	39,065±0,490
150	51,972±0,645
200	82,105±0,464

250	46,740±0,412
300	23,443±0,567

➤ t = 15 menit

Run 1

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,169	43,058
150	0,217	55,308
200	0,386	98,596
250	0,196	49,985
300	0,100	25,448

Run 2

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,167	42,719
150	0,215	54,834
200	0,384	98,110
250	0,195	49,839
300	0,099	25,375

Suhu (°C)	Konsentrasi Rata-rata (mg Vitamin C/L)
100	42,888±0,240
150	55,071±0,335
200	98,353±0,344
250	49,912±0,103
300	25,412±0,052

➤ t = 20 menit

Run 1

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,281	71,605
150	0,334	85,131
200	0,394	100,443
250	0,206	52,537
300	0,143	36,386

Run 2

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,280	71,459
150	0,333	84,876
200	0,392	100,115
250	0,204	52,172
300	0,142	36,313

Suhu (°C)	Konsentrasi Rata-rata (mg Vitamin C/L)
100	71,532±0,103
150	85,003±0,180
200	100,279±0,232
250	52,355±0,258
300	36,349±0,052

➤ t = 25 menit

Run 1

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,086	22,057
150	0,182	46,485
200	0,267	68,178
250	0,163	41,599
300	0,064	16,406

## Run 2

Suhu (°C)	Absorbansi	Konsentrasi (mg Vitamin C/L)
100	0,085	21,802
150	0,180	45,828
200	0,264	67,266
250	0,162	41,417
300	0,060	15,422

Suhu (°C)	Konsentrasi Rata-rata (mg Vitamin C/L)
100	21,930±0,180
150	46,157±0,464
200	67,722±0,645
250	41,508±0,129
300	15,914±0,696

## C.5 Perhitungan Peredaman Radikal Bebas Vitamin C dan Sampel

### Peredaman Radikal Bebas Vitamin C

Konsentrasi	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
0	0,000	1,000
20	0,045	0,924
40	0,126	0,786
60	0,204	0,654
80	0,322	0,456
100	0,414	0,300

Rumus Peredaman Radikal Bebas:

= \_\_\_\_\_

$$\begin{aligned} & \text{Konsentrasi Vitamin C 40 mg/L} \\ & = \frac{0,59 - 0,126}{0,59} \times 100\% = 0,786 \end{aligned}$$

➤ Penentuan nilai  $IC_{50}$

Dari data peredaman radikal bebas Vitamin C di atas dibuat kurva yang menyatakan hubungan peredaman radikal bebas versus suhu. Diperoleh persamaan regresi linear yaitu,

$$y = -1,6925x + 1$$

Dimana  $y$  menyatakan  $IC_{50}$  kemampuan 50% senyawa untuk meredam radikal bebas, dan  $x$  adalah nilai % kemampuan dalam meredam radikal bebas. Semakin kecil nilai  $x$  semakin kuat kemampuan menangkal radikal bebas.

➤ Hasil Peredaman Radikal Bebas Ekstrak Daun Sirih merah:

Pada  $T = 100^\circ C$

Run 1

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,074	0,875
10	0,154	0,739
15	0,169	0,714
20	0,281	0,525
25	0,086	0,854

Run 2

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,070	0,881
10	0,152	0,743
15	0,167	0,717
20	0,280	0,526
25	0,085	0,855

Pada T = 150 °C

Run 1

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,122	0,794
10	0,205	0,652
15	0,217	0,633
20	0,334	0,435
25	0,182	0,692

Run 2

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,120	0,797
10	0,202	0,658
15	0,215	0,636
20	0,333	0,437
25	0,180	0,696

Pada T = 200 °C

Run 1

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,237	0,599
10	0,323	0,453
15	0,386	0,346
20	0,394	0,334
25	0,267	0,548

Run 2

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,235	0,603
10	0,320	0,458

15	0,384	0,349
20	0,392	0,336
25	0,264	0,554

Pada T = 250 °C

Run 1

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,094	0,841
10	0,184	0,688
15	0,196	0,669
20	0,206	0,652
25	0,163	0,724

Run 2

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,092	0,844
10	0,182	0,692
15	0,195	0,669
20	0,204	0,654
25	0,162	0,725

Pada T = 300 °C

Run 1

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,064	0,891
10	0,093	0,842
15	0,100	0,831
20	0,143	0,759
25	0,064	0,891



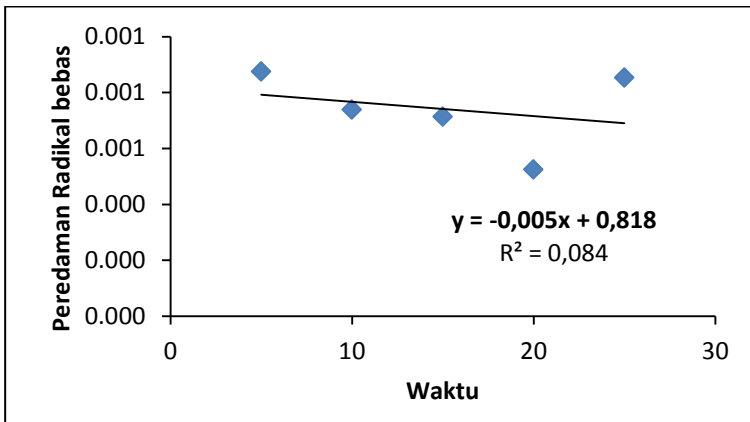
Run 2

Waktu	Absorbansi	Peredaman Radikal Bebas
5	0,060	0,898
10	0,090	0,847
15	0,099	0,832
20	0,142	0,759
25	0,060	0,898

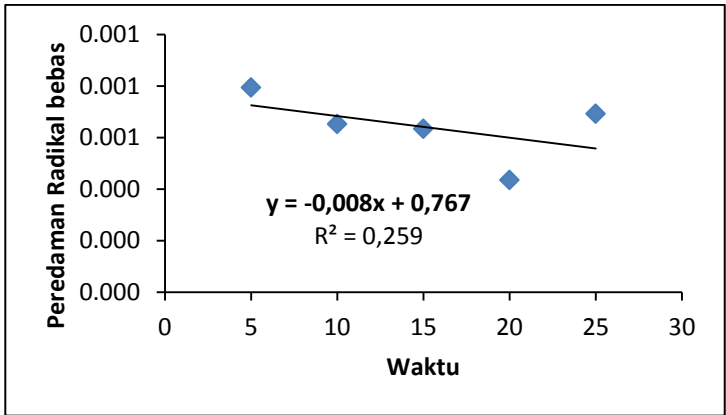
- Hasil  $IC_{50}$  Sampel Ekstrak Daun Sirih Merah  
Dari data peredaman radikal bebas di atas dibuat kurva peredaman radikal bebas versus waktu, sehingga diperoleh persamaan

$$y = -0,0017x + 0,8676$$

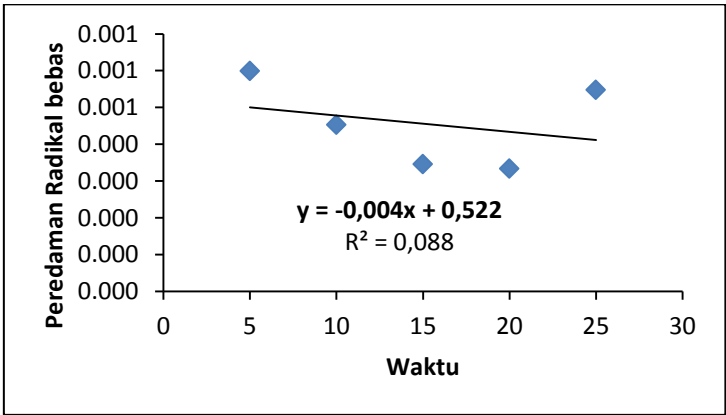
Pada  $T = 100^{\circ}C$



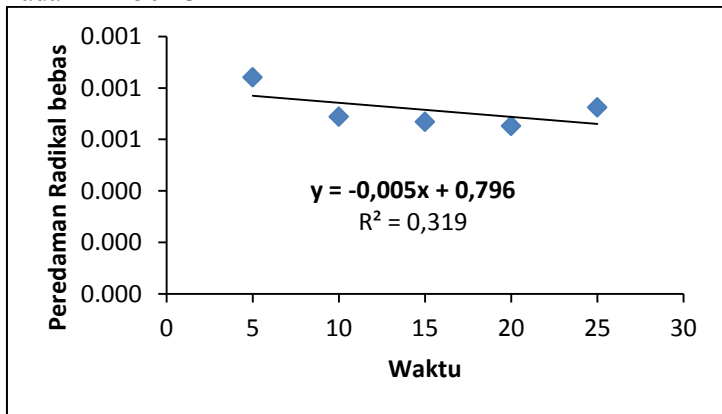
Pada T = 150°C



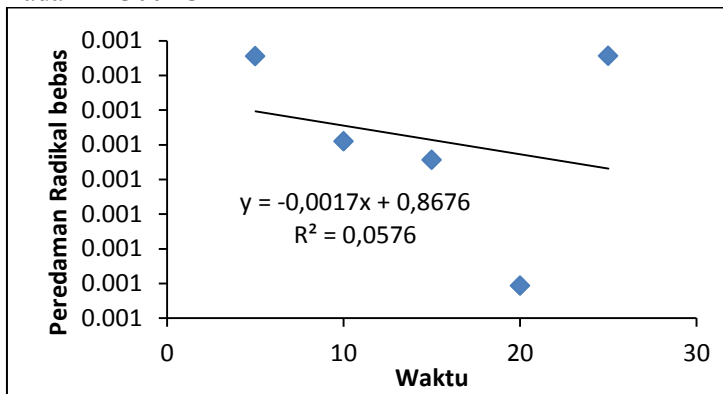
Pada T = 200°C



Pada T = 250 °C



Pada T = 300 °C



Suhu (°C)	100	150	200	250	300
IC <sub>50</sub>	62,471	31,857	6,306	54,833	216,235